

CAROLINE CARDOZO GASPARIN

CAROLINE CARDOZO GASPARIN

2014

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DOS GENES *LDLR*, *APOB* E
APOE NO PERFIL LIPÍDICO DE ADULTOS

CURITIBA

2014

CAROLINE CARDOZO GASPARIN

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DAS VARIANTES DOS GENES *LDLR*, *APOB* E
APOE NO PERFIL LIPÍDICO DE ADULTOS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Genética da Universidade Federal do
Paraná como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lupe Furtado-
Alle.

CURITIBA

2014

G249a Gasparin, Caroline Cardozo
Análise da influência das variantes dos genes *LDLR*, *APOB* e *APOE* no perfil lipídico de adultos / Caroline Cardozo Gasparin. – Curitiba, 2014.
684f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética, 2014.

Orientador: Lupe Furtado-Alle.

Bibliografia: p. 55-64.

1. Genética. 2. Hiperlipidemia. 3. Lipoproteínas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Furtado-Alle, Lupe. III. Título.

CDD: 616.3997042



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **CAROLINE CARDOZO GASPARI**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 31 de março de 2014

Doutora Lilian Pereira Ferrari
Unibrasil – Membro Titular

Doutora Nina Amália Brancia Pagnan
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutora Lupe Furtado Alle
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

DEDICATÓRIA

À Minha Mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Izaléia do Rosário Cardozo Gasparin, pelo amor incondicional, ensinamentos, incentivo, companheirismo e amizade.

À minha família em geral, pelo amor e apoio incondicionais.

À professora Lupe Furtado Alle, pela paciência, competência, dedicação e constante orientação, contribuindo muito para a minha formação.

Ao professor Ricardo Lehtonen de Souza, pela atenção e disponibilidade prestadas ao desenvolvimento deste trabalho.

À professora Lilian Pereira Ferrari, pela atenção, acessibilidade e cordialidade imensas, além do fornecimento dos reagentes para genotipagem do gene *LDLR*.

Aos colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação e do Departamento de Genética da UFPR, pela contribuição na realização deste trabalho.

À Deus, pela vida, família e amigos.

A falsa ciência gera ateus; a verdadeira
ciência leva os homens a se curvarem
diante de Deus.

Voltaire

RESUMO

As dislipidemias constituem fatores de risco para Doença Arterial Coronariana (DAC), que representa um importante problema de saúde pública. Muitos genes influenciam os níveis lipêmicos, tais como *LDLR*, *APOE* e *APOB*. Na maioria das populações estudadas o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* relaciona-se com altos níveis de LDL-Colesterol (LDL-C). Há ainda a mutação *R3500Q* do gene *APOB*, a qual foi identificada como sendo a causa do Defeito Familiar da APOB-100 (DFB-100). Já a mutação *C660X* do gene *LDLR*, é uma das principais alterações genéticas que leva à Hipercolesterolemia Familiar (HF). Visto a relevância do assunto objetivou-se verificar a existência de associação entre a mutação *C660X*, dos alelos do gene *APOE* e da mutação *R3500Q* e dislipidemias. A metodologia seguiu extração de DNA por salting-out, genotipagem por PCR-RFLP e por Taqman. Foram analisados 214 indivíduos e a mutação *C660X* foi investigada em apenas 72 das 214 amostras, as quais se caracterizavam por altos níveis de lipídios, mas nenhuma apresentou a alteração. As frequências dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ foram respectivamente $9,25 \pm 0,4625$; $70,5 \pm 3,525$ e $20,25 \pm 1,401$, enquanto que a frequência da mutação *R3500Q* foi de $4,46 \pm 1,00$ e diferem das frequências encontradas em outras pesquisas. Encontrou-se uma associação significativa entre a mutação *R3500Q* e aumentos dos níveis de Colesterol Total (CT), sendo tal alteração genética um fator de risco para níveis elevados de CT independente de gênero e idade. O alelo $\epsilon 4$ foi mais frequente em indivíduos com níveis mais altos de CT e LDL-C, já o alelo $\epsilon 2$ apresentou maior frequência em indivíduos com níveis maiores de HDL-C.

Palavras – chave: Gene *APOB*. Gene *APOE*. Dislipidemias.

ABSTRACT

Dyslipidemia are risk factors for coronary artery disease (CAD), which represents an important public health problem. Many genes influencing lipid levels, such as *LDLR*, *APOE* and *APOB*. In most populations studied the $\epsilon 4$ allele of the *APOE* gene is related to high levels of LDL-cholesterol (LDL-C). There is also the *R3500Q* mutation of the *APOB* gene which has been identified as the cause of the defect Family apoB-100 (DFB-100). Since the *LDLR* gene mutation *C660X*, is a major genetic alterations leading Familial hypercholesterolemia (FH). Seen how relevant it is aimed to verify the existence of association between the *C660X* mutation, alleles of the *APOE* gene and the *R3500Q* mutation and dyslipidemia. The methodology followed extraction DNA by salting-out, genotyping by PCR-RFLP and Taqman. 214 individuals were analyzed and *C660X* mutation was investigated in only 72 of the 214 samples, which were characterized by high levels of lipids, but none showed the change. The frequencies of alleles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ and $\epsilon 4$ were respectively 9.25 ± 0.4625 ; 70.5 ± 3.525 $20.25 \pm 1.401\%$, while the frequency of *R3500Q* mutation was $4.46 \pm 1.00\%$ and frequencies differ from those found in other studies. We found a significant association between *R3500Q* mutation and increased levels of total cholesterol (TC) and this genetic alteration a risk factor for high levels of CT regardless of gender and age. The $\epsilon 4$ allele was more frequent in individuals with higher levels of TC and LDL-C, whereas the $\epsilon 2$ allele showed higher frequency in individuals with higher levels of HDL-C.

Key - Words: *APOB* gene. *APOE* gene. Dyslipidemias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Tipos funcionais das mutações no gene *LDLR*

FIGURA 1 (ARTIGO) - Frequências genotípicas nos grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana” para o gene *APOE*.

FIGURA 2 (ARTIGO) - Frequências genotípicas nos grupos “LDL-C abaixo da mediana” e “LDL-C acima da mediana” para o gene *APOE*.

FIGURA 3 (ARTIGO) - Frequências genotípicas nos grupos “HDL-C abaixo da mediana” e “HDL-C acima da mediana” para o gene *APOE*.

FIGURA 4 (ARTIGO) - Frequências genotípicas nos grupos “TG abaixo da mediana” e “TG acima da mediana” para o gene *APOE*.

FIGURA 1 (APÊNDICE) - Gel de Agarose a 0,5%, mostrando os fragmentos de DNA gerados após a digestão enzimática com a *Hinf I*.

FIGURA 2 (APÊNDICE) - Gel de Poliacrilamida a 9% para análise do gene *LDLR*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de referência para o perfil lipídico para indivíduos adultos com idade ≥ 20 anos.

TABELA 2 - Estatística descritiva para as variáveis idade, IMC e de perfil lipídico dos 214 indivíduos analisados no presente estudo.

TABELA 3 - Dados da amostra estratificada: Abaixo da mediana e Acima da mediana das variáveis do estudo para os indivíduos genotipados para as variantes do genes *APOB* e *APOE*.

TABELA 4 - Frequências alélicas e genotípicas para a mutação R3500Q (rs5742904), o gene *APOB*.

TABELA 5 - Frequências alélicas e genotípicas da mutação R3500Q do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do CT.

TABELA 6 - Frequências alélicas e genotípicas da mutação R3500Q do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do LDL-C.

TABELA 7 – Frequências alélicas e genotípicas da mutação R3500Q do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do HDL-C.

TABELA 8 - Frequências alélicas e genotípicas da mutação R3500Q do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do TG.

TABELA 9 - Frequências alélicas e genotípicas de todos os indivíduos genotipados para o gene *APOE*.

TABELA 10: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do CT.

TABELA 11: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do CT.

TABELA 12: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do HDL-C.

TABELA 13: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do TG.

TABELA 14: Estatística descritiva (N, média, mínimo, máximo e desvio padrão) das variáveis do estudo nos indivíduos agrupados por genótipo do gene *APOE*.

LISTA DE SIGLAS

ACAT – Acil-colesterol-acil-transferase
APOB - Apoproteína B
APOB-100 - Apoproteína B 100
APOE - Apoproteína E
AVC – Acidente Vascular Cerebral
ARH – Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva
cm – Centímetro

CT - Colesterol Total
DA – Doença de Alzheimer
DAC – Doença Arterial Coronariana
DHPLC – Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Eficiência
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
dNTP – Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina I
HDL-C - Lipoproteína de Alta Densidade
FFA – Ácidos Graxos Livres
g - Gramas
h – Horas
HF – Hipercolesterolemia Familiar
HMG-CoA-redutase – 3-Hidroxi-metil-glutaril-coenzima A redutase
IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária
IMC - Índice de Massa Corporal
LDL-C - Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLRAP1 – LDL Receptor Adaptador Protein 1
LPL – Lipoproteína Lipase
LRP – Lipoproteína de Ligação ao Receptor LDL-C
Kg – Quilogramas
m – Metros

mA – miliampères

Min – minutos

mM – milimol

mg/dl – mligramas por decilitro

Mismatch PCR-RFLP – Mismatch Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

NCHS – National Center for Health Statistics

ng – nanogramas

OMS - Organização Mundial da Saúde

pbs – pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCSK9 – Proteína Subtilisina Quexina tipo 9

pM – picomol

RFLP – Polimorfismos de Tamanho de Fragmento de Restrição

LDLR – Receptor de LDL-C

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SSCP – Polimorfismo Conformacional de Fita Simples

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TG - Triglicerídeos

UFPR – Universidade Federal do Paraná

U/ml – Unidades por mililitro

VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

V – Volts

W – Watts

µL – microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

C - graus Celsius

% - porcentagem

> - Maior

\geq - Maior ou Igual

< - Menor

\leq - Menor ou Igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE	3
3. JUSTIFICATIVA	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 GERAL	5
4.2 ESPECÍFICOS	5
5. REVISÃO DE LITERATURA	6
5.1 DISLIPIDEMIAS	6
5.2 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS	7
5.3 DISLIPIDEMIAS DE CAUSA GENÉTICA	9
5.3.1 <i>Receptor das LDL-C (LDLR)</i>	9
5.3.2 <i>APOB-100</i>	13
5.3.3 <i>APO E</i>	14
6. CAPÍTULO 1: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES C660X DO GENE LDLR, R3500Q DO GENE APOB E VARIANTES DO GENE APOE E DISLIPIDEMIAS	18
6.1 INTRODUÇÃO	19
6.2 METODOLOGIA	21
6.2.1 <i>Lipidograma</i>	22
6.2.2 <i>Análises Moleculares</i>	23
6.3 RESULTADOS	24
6.4 DISCUSSÃO	42
6.5 CONCLUSÃO	45
6.6 REFERÊNCIAS	46
7. DISCUSSÃO GERAL	52

8. CONCLUSÕES	54
9. REFERÊNCIAS	55
10. APÊNDICES	65
10.1 DESCRIÇÃO DETALHADA DAS METODOLOGIAS E RESULTADOS	65
10.1.1 <i>PCR-RFLP para a mutação C660X do gene LDLR</i>	65
10.1.2 <i>Validação da atividade da enzima Hinf I</i>	66
10.1.3 <i>Resultados</i>	67
11. ANEXO	68
11.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	68

1. INTRODUÇÃO

As dislipidemias constituem distúrbios do metabolismo lipídico, resultando em alterações nos níveis séricos de lipoproteínas, incluindo elevadas concentrações de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL-C) (BERTONI, ZANARDO e CENI, 2011). Estão muito relacionadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, tais como a aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica cardíaca e Acidente Vascular Cerebral (AVC), e, portanto, tem grande relevância em saúde pública (ANVISA, 2011; BERTONI, ZANARDO e CENI, 2011). Segundo a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), durante os últimos trinta anos ocorreram elevações relativamente rápidas e substanciais da mortalidade por causas cardiovasculares em países em desenvolvimento, como o Brasil. Conforme as projeções da Organização Mundial de Saúde, tal propensão de aumento na doença cardiovascular tende a persistir, o que agrava mais o quadro de morbidade e mortalidade elevadas nestes países.

As dislipidemias são classificadas em dois principais grupos: causas primárias - situações em que são causadas por alterações genéticas, modificando a síntese e degradação de lipoproteínas, assim como a relação entre as lipoproteínas e seus receptores – e causas secundárias - em crianças e adolescentes são ocasionadas principalmente por erros alimentares, doenças associadas ou pela utilização de medicamentos que modifiquem o perfil lipídico (OLIVEIRA e CASTRO, 2010). Variantes dos genes *LDLR*, *APOB* e *APOE* constituem exemplos importantes de causa primária de dislipidemias.

Portanto, a presente pesquisa foi desenvolvida tendo por objetivo observar se há relação entre variantes dos genes *APOE*, a mutação *R3500Q* do gene *APOB* e a mutação *C660X* do gene *LDLR* com alterações no perfil lipídico em uma amostra de adultos da população de Curitiba/PR; a de comparar as frequências alélicas em diferentes populações (Registro CEP/SD de aprovação pelo Comitê de Ética em

Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR: 1159.084.11.06 e CAAE: 0082.0.091.000-11).

Os resultados e discussão serão apresentados na forma de um capítulo nos moldes de um artigo científico.

2. HIPÓTESE

Considerando as literaturas abordadas, espera-se observar associação entre níveis elevados de lipídios e as alterações genéticas estudadas.

3. JUSTIFICATIVA

As dislipidemias são consideradas de grande relevância na saúde pública, estando fortemente associadas a Doença Arterial Coronariana (DAC). É fundamental realizar o diagnóstico precoce da doença, pois dessa forma é possível prevenir o processo aterosclerótico e iniciar terapia disponível sob a forma de mudança de estilo de vida, e pela utilização de fármacos que reduzem o nível de colesterol (estatinas, niacinas, entre outros) (GENETEST, 2010; WALUS´MIARKA *et al.*, 2012; TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012). Além disso, novos fármacos estão sendo pesquisados para superar os antigos que geralmente apresentam efeitos colaterais importantes (TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012). O uso de critérios clínicos (níveis lipídicos, história familiar e existência de xantomas) sem acesso a diagnóstico genético leva a um diagnóstico errado em aproximadamente 25% dos casos, portanto o diagnóstico genético constitui uma ferramenta importante. O rastreio genético é recomendado por muitas organizações internacionais, tal como a Sociedade Européia de Aterosclerose (GENETEST, 2010). Considerando a relevância do assunto, tem-se por objetivo observar se há relação entre variantes dos genes *APOE*, a mutação *C660X* do gene *LDLR* e a mutação *R3500Q* do gene *APOB* com alterações no perfil lipídico em uma amostra de adultos com dislipidemia da população de Curitiba/PR.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Investigar associação entre os alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene *APOE*, a mutação *C660X* do gene *LDLR* e da mutação *R3500Q* do gene *APOB* e dislipidemias em amostra de adultos da população de Curitiba-PR.

Objetivos específicos

- Comparar as frequências encontradas às descritas nas literaturas abordadas;
- Comparar as frequências dos SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) abordados em indivíduos com níveis mais altos e mais baixos de CT, LDL-C, TG e HDL-C.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 DISLIPIDEMIAS

Dislipidemias são alterações no perfil lipídico, sendo a hipercolesterolemia uma doença caracterizada por altos níveis de colesterol no sangue. É a principal causa de DAC, resultando na formação da placa ateromatosa, ao associar-se a outros fatores biológicos e/ou ambientais, elevando o risco de morte por infarto do miocárdio (VIEIRA, 2005; TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012).

A combinação DAC e alterações do perfil lipídico – em particular a hipercolesterolemia – tem sido amplamente evidenciada, seja por meio de estudos anatomopatológicos e experimentais, ou de estudos epidemiológicos, clínicos e de intervenção terapêutica (FORTI *et al.*, 2003).

Sabe-se que a colesterolemia é influenciada por fatores ligados à idade, gênero, hábitos de vida, utilização de certos medicamentos, certas doenças, e também fatores genéticos. Dentre os fatores genéticos é possível destacar as mutações que podem modificar a estrutura e função de proteínas relacionadas à síntese, à homeostase e ao metabolismo do colesterol, como apolipoproteínas, receptores e enzimas (FORTI *et al.*, 2003).

As dislipidemias são divididas em dois principais grupos: causas primárias - situações em que são causadas por alterações genéticas, modificando a síntese e degradação de lipoproteínas, assim como a relação entre as lipoproteínas e seus receptores – e causas secundárias - em crianças e adolescentes são ocasionadas principalmente por maus hábitos alimentares, doenças associadas ou pela utilização de medicamentos que modifiquem o perfil lipídico (OLIVEIRA e CASTRO, 2010).

5.2 METABOLISMO DOS LIPÍDIOS

Lipídios são uma classe de compostos praticamente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. De forma geral, são subdivididos em seis grupos, baseados na sua estrutura química: colesterol, ácidos graxos, acilgliceróis, esfingolipídios, prostaglandinas e terpenos (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008).

O colesterol é um lipídio anfipático o qual encontra-se quase que exclusivamente em animais, sendo um componente essencial da membrana de todas as células. Além disso, é um precursor de ácidos biliares, hormônios esteróides e vitaminas (BURTIS, ASHWOOD e BRUNS, 2008; OLIVEIRA e CASTRO, 2010). Faz-se necessário que a gordura absorvida da dieta e os lipídios produzidos pelo fígado e pelo tecido adiposo sejam transportados entre os tecidos e órgãos, para uso e armazenamento. Devido à insolubilidade dos lipídios em água, estes são transportados no plasma sanguíneo aquoso por meio da associação dos lipídios apolares (triglicerídio e colesteril éster) aos lipídios anfipáticos (fosfolipídios e colesterol) e às proteínas, para construir lipoproteínas miscíveis em água. As lipoproteínas transportam os lipídios dos intestinos, sob a forma de quilomícrons, - e do fígado, através da forma de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), - à grande parte dos tecidos para que sejam oxidados, e ao tecido adiposo, para armazenamento. É como ácidos graxos livres (FFA) ligados à albumina sérica que os lipídios são mobilizados do tecido adiposo. Várias condições patológicas que afetam o transporte dos lipídios devem-se principalmente a defeitos herdados, alguns causam hipercolesterolemia e aterosclerose prematura (MURRAY, GRANNER e RODWELL, 2007).

Normalmente a quantidade de colesterol total do organismo adulto, mantém-se relativamente constante, porque a quantidade que é transformada (em sais biliares, hormônios sexuais, corticosteróides, vitamina D) ou excretada nas fezes, tem sua reposição pela dieta e síntese endógena. A estrutura dessa substância contém um núcleo ciclo pentano peridro fenantreno hidroxilado em C3, uma dupla ligação em C5 e uma cadeia alifática ramificada com 8 carbonos em C17. No total são 27 carbonos (FONTES, 2010).

Apesar de ocorrer síntese endógena de aproximadamente 0,5 g de colesterol ao dia, parte dele é oriundo da dieta (FONTES, 2010; TRAPANI, SEGATTO e

PALLOTTINI, 2012). Ocorre hidrólise dos colestérideos (ésteres de colesterol) da dieta no lúmen intestinal, por meio de uma hidrolase de origem pancreática. Para que ocorra a absorção do colesterol é imprescindível a presença de sais biliares (FONTES, 2010).

O colesterol é re-esterificado nos enterócitos por ação da ACAT (acil-colesterol-acil-transferase). Os ésteres de colesterol produzidos e o colesterol livre incorporam-se depois aos quilomícrons – lipoproteínas de maiores dimensões e também menos densas. O colesterol da dieta é captado pelo fígado quando da endocitose dos quilomícrons remanescentes. Apesar de o colesterol ser excretado na bile pelo fígado - como colesterol ou como sais biliares produzidos a partir do colesterol - parte dele que aí chega é vertido na corrente sanguínea incorporado nas lipoproteínas denominadas VLDL (FONTES, 2010).

O colesterol das VLDL pode originar (via IDL – Lipoproteína de Densidade Intermediária) as LDL-C (Lipoproteína de Baixa Densidade) que são as principais transportadoras de colesterol (FONTES, 2010).

As LDL-C são endocitadas pelos tecidos (incluindo o fígado) ligando-se previamente aos receptores das LDL-C. O colesterol dos tecidos extra-hepáticos captado pelas HDL-C também é, depois de esterificado, vertido no fígado. O mecanismo principal através do qual o colesterol plasmático (esterificado e não esterificado) é captado para os tecidos envolve a ação de receptores das LDL-C, os quais se ligam à Apolipoproteína B 100 (APOB-100) destas lipoproteínas, possibilitando sua endocitose. No interior das células os ésteres de colesterol são hidrolisados nos lisossomos resultando na formação de colesterol livre (FONTES, 2010).

Este colesterol e o que é produzido pelas células pode ser esterificado com ácidos graxos levando à formação de colestérideos (ésteres de colesterol), ficando agrupados em gotículas intracelulares. Assim como nos enterócitos, nas outras células a enzima esterificante é a ACAT. A atividade dos receptores das LDL-C eleva-se quando a dieta é rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados e pobre em saturados. A atividade dos receptores das LDL-C também está elevada (por indução da transcrição do gene que o codifica) quando diminui a quantidade de colesterol intracelular (FONTES, 2010).

5.3 DISLIPIDEMIAS DE CAUSA GENÉTICA

A hipercolesterolemia, como já comentado, pode ser ocasionada por fatores genéticos. Entre as mutações e polimorfismos envolvidos no aumento sérico de colesterol, é possível destacar os que ocorrem nos genes da apolipoproteína B 100 (*APOB*), da apolipoproteína E (*APOE*), da enzima conversora da angiotensina I (ECA) e, principalmente, dos genes do receptor de LDL-C (*LDLR*) e da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (FORTI *et al.*, 2003).

5.3.1 RECEPTOR DAS LDL-C (LDLR)

A elevação do colesterol pode ter causa genética, quando o indivíduo possui uma mutação no gene que codifica o receptor das LDL-C (*LDLR*), a *APOB* 100 ou de forma mais rara no gene que codifica a Proteína convertase subtilisina quexina tipo 9 (*PCSK9*). Alterações em um desses genes leva à hipercolesterolemia (BOURBON, 2008; MACEDO, 2006; FORTI *et al.*, 2003).

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é a forma mais comum e também grave de hipercolesterolemia monogênica, sendo autossômica dominante. Foi a primeira doença genética relacionada ao metabolismo dos lipídios que foi caracterizada clinicamente e em relação às suas bases moleculares. Pode se manifestar nas formas homozigótica, em que não há nenhum receptor de LDL-C, e heterozigótica, em que há 50% desses receptores funcionais (MACEDO, 2006).

Na forma homozigota, a doença afeta 1: 1 000 000 de habitantes. Esta é a forma mais rara e grave, apresentando forte correlação com aterosclerose precoce. Antes dos 10 anos de idade o paciente pode ser acometido por infarto agudo do miocárdio, aterosclerose coronária grave e estenose aórtica. Xantomas (lesões de acúmulo de gordura na pele ou sobre tendões), arco corneano lipídico (halo esbranquiçado em volta da córnea) e colesterol total superior a 500 mg/dL caracterizam a doença (LL *et al.*, 2007; MACEDO, 2006).

A forma heterozigota é mais frequente, atingindo 1 a cada 400-500 pessoas, sendo que as concentrações de LDL plasmático situam-se, comumente entre 200

mg/dL e 400 mg/dL (CHACRA, SANTOS e MARTINEZ, 2004; LL, *et al.*, 2007; MACEDO, 2006). Determinadas populações como os canadenses de Québec, sul africanos (afrikaners), libaneses e finlandeses possuem maior prevalência dessas mutações. Estima-se que 10 milhões de pessoas no mundo tenham HF, porém menos de 10% são diagnosticadas e destas menos de 25% recebem tratamento com drogas hipolipemiantes (MACEDO, 2006).

Na forma heterozigótica, o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar, é sugerido pela presença de níveis plasmáticos aumentados de CT e de LDL-C, concentrações de triglicérides e HDL-C normais, existência de xantomas ou xantelasma, além de história familiar de doença coronariana prematura ou de hipercolesterolemia. Aproximadamente 25% dos pacientes com hipercolesterolemia familiar heterozigótica não possuem xantomas; quando existem, o surgimento se dá a partir da terceira década de vida. Para o diagnóstico de HF, podem ser usados dois critérios: “The Simon Broome Register”, desenvolvido na Inglaterra, e o “Dutch Lipid Clinic Network”, elaborado na Holanda e adotado pela Organização Mundial da Saúde, em publicação sobre a doença em 1999. O primeiro classifica os portadores da doença como definitivos ou possíveis, conforme os níveis plasmáticos de LDL-colesterol em adultos e em crianças com idade inferior a 16 anos, evidências de transmissão dominante da doença e idade de instalação do início da doença arterial coronariana. Foi incluída na revisão de 1994, como critério diagnóstico definitivo de HF, a presença da mutação do *LDLR* ou o defeito familiar da APOB 100, baseados em estudos de DNA. No segundo, há a utilização de critérios similares, cada critério diagnóstico ganha uma pontuação, como um escore numérico. Após somado e conforme o resultado obtido, é possível determinar um diagnóstico mais preciso da existência ou não da doença. Considera-se o diagnóstico como sendo de certeza se o escore for superior a 8, provável se ficar entre 6 e 8 e possível se estiver entre 3 e 5. Inferior a 3 não se considera o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar. A maior divergência entre esses critérios é a necessidade da presença de xantomas, na ausência de mutações gênicas identificadas, como mostra o “The Simon Broome Register”. De acordo com “Dutch Lipid Clinic Network”, se o escore é igual ou superior a 8, há uma probabilidade de 83% de se encontrar uma mutação (CHACRA, SANTOS e MARTINEZ, 2004).

Esta doença tem muita importância na área de saúde pública e isso se deve à alta prevalência de doença coronária precoce e à diminuição da expectativa de vida

verificada em várias famílias. Se não tratados de forma adequada, cerca de 85% dos homens e 50% das mulheres podem ter um evento coronário antes dos 65 anos de idade. Através do tratamento adequado vários pacientes que apresentam a doença podem reduzir significativamente o LDL-C e aumentar de 10 a 30 anos a expectativa de vida. Por isso a identificação precoce desses indivíduos e de seus parentes, assim como início do tratamento imediato, são essenciais para prevenir doença cardiovascular precoce e óbito nessa população (MACEDO, 2006).

O receptor da LDL-C é uma glicoproteína de membrana, constituído de duas cadeias de oligossacarídeos complexos ligados a aspargina e 18 cadeias de oligossacarídeos ligados a serina/treonina. É expresso principalmente nas membranas dos hepatócitos e de outras células como as esteroideogênicas, removendo da circulação as lipoproteínas de baixa densidade através da endocitose (MACEDO, 2006).

Esse receptor é produzido no retículo endoplasmático rugoso e passa para o complexo de Golgi – local em que aumenta seu peso molecular. Depois de 45 minutos do início do processo de síntese, ele já se encontra expresso na superfície da célula. O receptor da LDL-C se liga a duas apolipoproteínas: APOB 100, presente nas partículas de LDL-C, e a APOE e seus remanescentes, existente nas VLDLs e nos quilomícrons. Ao se ligar no receptor na superfície do hepatócito, a partícula de LDL-C e o receptor sofrem um processo de invaginação formando os endossomas. Estes ligam-se aos lisossomos para hidrólise das lipoproteínas no citoplasma das células hepáticas. O receptor de LDL-C consegue escapar dessa hidrólise, retornando à superfície celular para remover, novamente, LDL-C da circulação (MACEDO, 2006).

O gene *LDLR* está situado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.2), apresentando 18 éxons, 17 íntrons e codifica uma proteína de 839 aminoácidos. A HF é monogênica com transmissão mendeliana e com alto risco cardiovascular (BOURBON, 2008; MACEDO, 2006; FORTI *et al.*, 2003).

Mais de 1000 mutações foram descritas no gene *LDLR*, alterando todos os domínios da proteína associados ao fenótipo da hipercolesterolemia familiar (TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012; FORTI *et al.*, 2003). Como demonstrado na **Figura 1**, essas mutações podem ser classificadas em 5 tipos funcionais: tipo 1 – provocam deficiência na produção do receptor; tipo 2 (mais comum) – originam proteínas incapazes de serem transportadas entre o retículo

endoplasmático e o Complexo de Golgi (2a) ou sintetizam proteínas capazes de serem transportadas, no entanto em quantidades muito baixas (2b); tipo 3 – sintetizam proteínas que alcançam a superfície da célula, mas não possuem capacidade de ligação; tipo 4 – raras, produzem receptores que podem ligar LDL-C, porém não são interiorizadas; tipo 5 – produzem receptores que apresentam a capacidade de ligação à LDL-C, são internalizados, mas não liberam as LDL-C nos endossomos, impedindo a reciclagem dos receptores (FORTI *et al.*, 2003).

FIGURA 1: Tipos funcionais das mutações no gene *LDLR*. *Tipo 1* – provocam deficiência na produção do receptor; *tipo 2 (mais comum)* – originam proteínas incapazes de serem transportadas entre o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi (2a) ou sintetizam proteínas capazes de serem transportadas, no entanto em quantidades muito baixas (2b); *tipo 3* – sintetizam proteínas que alcançam a superfície da célula, mas não possuem capacidade de ligação; *tipo 4* – raras, produzem receptores que podem ligar LDL-C, porém não são interiorizadas; *tipo 5* – produzem receptores que apresentam a capacidade de ligação à LDL-C, são internalizados, mas não liberam as LDL-C nos endossomos, impedindo a reciclagem dos receptores (FORTI *et al.*, 2003).

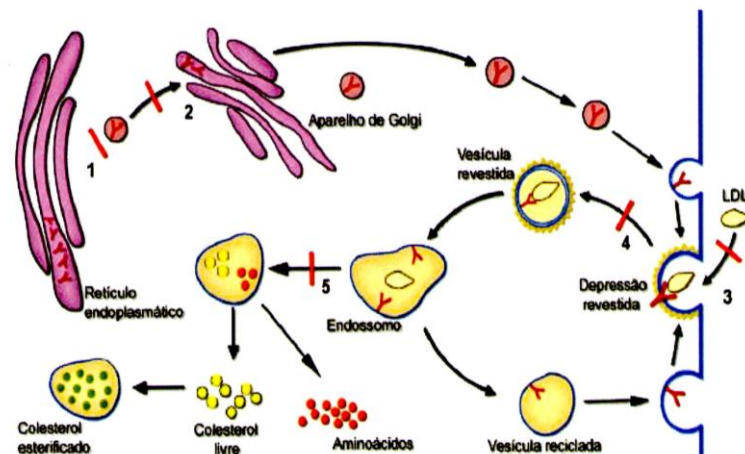


Figura 1: Representação das cinco classes de mutações do receptor da LDL.

Fonte: MACEDO, 2006

A expressão clínica das mutações no gene *LDLR* é variável, podendo ser atribuída a: 1) diferentes efeitos das mutações sobre a afinidade de ligação do LDLR pelas partículas contendo APOB 100 ou APO E; 2) efeito funcional da mutação; 3) epistasia dominante; 4) presença de polimorfismos em outros genes (FORTI *et al.*, 2003).

Na maioria dos tecidos, para que ocorra a internalização do LDLR é necessária uma proteína adaptadora a qual se liga à cauda citoplasmática do receptor, a LDLRAP1 (*LDL receptor adaptor protein 1*). De início essa proteína foi denominada ARH (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia), pois mutações em seu gene são responsáveis por uma forma recessiva de hipercolesterolemia familiar (SILVA, 2007; TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012). Mutações nesse gene lavam a um fenótipo semelhante a da forma homozigótica de HF, porém os níveis lipídicos não são tão elevados (TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012). No Brasil, o estudo molecular das mutações do gene *LDLR* iniciou-se em Ribeirão Preto (Sudeste do país) por pesquisadores liderados por Zago e Santos, os quais encontraram em 14 famílias das 16 pesquisadas, o “alelo libanês”, uma mutação C>A no éxon 14, do tipo nonsense C660X, resultando na síntese de uma proteína truncada, sem atividade funcional. Apesar da pequena contribuição do povo árabe (inferior a 1%), a mutação C660X possui prevalência de 30% dos pacientes atendidos no Ambulatório de Nutrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. É provável que esta mutação represente uma das mais importantes causas de HF no Brasil (WERUTZKY, 2006).

5.3.2 APOB 100

O gene *APOB*, está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p24), sendo composto por 29 éxons e 28 íntrons (CASTILLO *et al.*, 2002).

Mutações no gene que codifica o receptor de LDL-Colesterol, são a causa genética mais comum de HF, mas essa doença também pode ser causada por mutações em outros genes, tais como: *APOB*, *PCSK9* e *ARH* (Hipercolesterolemia Autossômica Recessiva) (FARROKHI *et al.*, 2011; TRAPANI, SEGATTO e PALLOTTINI, 2012).

Mutações que ocorrem no gene da APOB 100, são a segunda causa do fenótipo clínico de HF. O gene da *APOB* localiza-se no cromossomo 2p24.1, e codifica uma proteína presente na partícula de LDL-Colesterol que é responsável pela sua ligação ao receptor de LDL-C. Mutações nesse gene irão alterar

drasticamente a sua atividade funcional, levando a uma diminuição da sua ligação com LDLR e, dessa forma, atrasando a liberação de partículas de LDL-C. Porém, em contraste com o *LDLR*, somente um pequeno número de mutações funcionais foram identificadas no gene da *APOB 100*, tais como *R3500Q*, *R3500W* e *R3531C* (FARROKHI *et al.*, 2011).

Os polimorfismos *R3500Q* (troca de arginina pela glutamina), *R3500W* (troca de arginina pelo triptofano), *R3531C* (troca de arginina por cisteína) constituem alterações que interferem na conformação do domínio de ligação da *APOB 100* com o receptor B/E. Dessa forma reduz a afinidade da LDL (lipoproteína de baixa densidade) por esse receptor, aumentando assim os níveis séricos de LDL (FORTI *et al.*, 2003).

A mutação *R3500Q* (G10699A) é a mais frequente das mutações do gene *APOB 100*, ocorrendo no éxon 26 e resultando na substituição de Arginina por uma Glutamina no domínio de ligação da proteína, reduzindo sua afinidade de ligação pelo LDLR (CASTILLO *et al.*, 2002).

5.3.3 APOE

Polimorfismos genéticos do gene da apolipoproteína E (*APOE*) têm sido associados à suscetibilidade a doenças cardiovasculares (SCHWANKE *et al.*, 2002). Aproximadamente 60 a 80% da *APOE* plasmática é produzida no fígado, e o cérebro é o segundo local com maior abundância de síntese de mRNA de *APOE*, ocorrendo essencialmente nos astrócitos. Os macrófagos também sintetizam essa proteína, que parece estar associada na modulação do acúmulo de colesterol nas artérias. O restante da produção da *APOE* se dá no baço, rim, pulmão, pele, células do músculo liso e órgãos esteroidogênicos, tais como as glândulas adrenais, testículos e ovários (FERREIRA, 2010).

Tal proteína, identificada no início da década de 1970, desempenha um papel no metabolismo das lipoproteínas, tendo ação no transporte da molécula de colesterol, sendo ligante do receptor de LDL-C e outros, ativadora de enzimas, como a lipase hepática e ainda está relacionada à síntese de VLDL hepáticas (SCHWANKE *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2007). Além disso, está relacionada com imunorregulação e rotas neurobiológicas (reparo neuronal, remodelamento e

proteção) (SOUZA *et al.*, 2007).

O gene da apolipoproteína E (*APOE*) está situado no cromossomo 19 (19q13.2), apresenta 4 éxons, 3 íntrons, 3597 nucleotídeos e codifica uma proteína polimórfica de 34 k-Da com 299 aminoácidos (FERREIRA, 2010; SOUZA *et al.*, 1998; SCOTT, KNOTT, SHAW e BROOK, 1985; RALL, WEISGRABER e MAHLEY, 1982). Desempenha um papel relevante no metabolismo das lipoproteínas com elevada concentração de triglicerídeos (remanescentes de quilomícrons e de VLDL) (FERREIRA, 2010 E SOUZA *et al.*, 1998). Essa proteína controla o catabolismo das lipoproteínas, agindo como um intermediário na sua ligação aos proteoglicanos do sulfato de heparan na superfície da célula (especialmente no fígado) e ao receptor LDL-C hepático ou com a LRP (proteína de ligação ao receptor LDL-C) (FERREIRA, 2010; BENNET *et al.*, 2007).

Três alelos do gene *APOE* ocorrem de maneira mais comum, sendo eles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ e codificam as três principais isoformas de *APOE*: E2 (cisteína/cisteína), E3 (cisteína/arginina) e E4 (arginina/arginina), respectivamente (FERREIRA, 2010 e SCHWANKE *et al.*, 2002). As isoformas de *APOE* são diferenciadas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do éxon 4 (SOUZA *et al.*, 1998).

Devido à substituição de uma única base nitrogenada (timina por citosina) em duas importantes posições da região que codifica a *APOE*, há as substituições únicas de aminoácidos resultando em polimorfismos genéticos no gene *APOE*. A *APOE2*, com uma cisteína no resíduo 158, é diferente da *APOE3* que tem a arginina no local. Já a *APOE3*, com uma cisteína no resíduo 112, é diferente da *APOE4* que tem arginina no local. Dessa maneira as três isoformas têm a seguinte composição: E2: Cys 112, Cys 158; E3: Cys 112, Arg 158 e E4: Arg 112, Arg 158 (FERREIRA, 2010).

Muitos estudos demonstraram a heterogeneidade dos alelos *APOE* entre as populações, havendo frequências alélicas diferentes em várias regiões (FERREIRA, 2010).

Essa proteína tem sido associada à Doença Arterial Coronariana (DAC), assim como a outras enfermidades. Dentre estas é possível incluir doenças cerebrovascular, arterial periférica e neurodegenerativa, como o início tardio da doença de Alzheimer, sendo um resultado das variações alélicas do gene *APOE* ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) (SOUZA *et al.*, 2007).

A forma mais comum de demência é a doença de Alzheimer (DA). A DA tardia é caracterizada pelos sintomas com início aos 65 anos de idade ou mais, correspondendo a aproximadamente 95% do total de casos. Existem evidências da associação entre o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* com a doença. No entanto, a herança do alelo $\epsilon 2$ parece diminuir o risco, além de retardar o aparecimento de DA, tendo um efeito protetor (CAÇÃO *et al.*, 2007; FERREIRA, 2010).

As isoformas de *APOE* diferem quanto a sua afinidade por receptores específicos, como o receptor de LDL-Colesterol e a proteína relacionada ao receptor de LDL-Colesterol. A *APOE4* apresenta uma afinidade levemente maior de ligação a esses receptores do que a *APOE3*, enquanto a *APOE2* raramente se liga, possuindo uma capacidade de ligação inferior a 2% da capacidade de *APOE3*. Dessa forma, os polimorfismos da *APOE* estão relacionados às concentrações plasmáticas de lipídios e de lipoproteínas em populações humanas, representando de 4 a 15% das variações na concentração de LDL-C (SOUZA *et al.*, 2007).

Tem-se associado o alelo $\epsilon 4$ (fenótipos E3/4 e E4/4) a elevados níveis séricos de LDL, sendo, portanto, considerado um fator de risco para DAC. Já o alelo $\epsilon 2$ (E2/2 e E2/3) parece associar-se com os baixos níveis de LDL-C e elevação da concentração de triglicerídeos plasmáticos e lipoproteínas remanescentes (SOUZA *et al.*, 2007).

Altos níveis de LDL-C e de CT foram observados, em ordem decrescente, nos seguintes fenótipos: E2/3 < E3/3 < E4/3 < E4/4. A alta frequência do alelo $\epsilon 4$ tem sido associada à elevação na concentração de triglicerídeos e diminuição de HDL-C. No entanto, o efeito dos polimorfismos da *APOE* sobre os níveis plasmáticos de lipídeos é variável nas diferentes populações e regiões (SOUZA *et al.*, 2007).

Segundo trabalho realizado por BENNET *et al.*, 2007, as concentrações de LDL-Colesterol foram cerca de 30% menores em indivíduos E2/E2 do que em indivíduos E4/E4, uma diferença que pode ser comparada a produzida por uso de estatina (BENNET *et al.*, 2007).

O genótipo $\epsilon 2/\epsilon 2$ relaciona-se a hiperlipoproteinemia tipo III, também conhecida por disbetalipoproteinemia, a qual se caracteriza pelo acúmulo dos remanescentes das partículas de quilomícrons e de VLDL. O perfil lipídico característico é um aumento de TG e do CT (FERREIRA, 2010). HOPKINS, WU, HUNT e BRINTON, 2005 demonstraram um risco prematuro elevado de DAC

familiar em indivíduos com hiperlipidemia tipo III, com concentrações séricas aumentadas de TG (HOPKINS, WU, HUNT *et al.*, 2005).

As isoformas APOE2 e APOE3 se ligam de forma preferencial aos fosfolípidos da HDL, já a APOE4 liga-se preferencialmente a TG do VLDL. A substituição de uma cisteína pela arginina no resíduo 112 da isoforma APOE4, induz uma mudança conformacional na sua estrutura, o que confere a isoforma uma elevada afinidade de ligação aos receptores de LDL-C, superior até que aquela observada com a isoforma E3. Como as partículas de VLDL, IDL e quilomícrons são removidos de forma muito rápida do plasma, há um mecanismo de *feedback* que ativa uma resposta hepática de diminuição de expressão de receptores de LDL-C, resultando no aumento dos níveis séricos de LDL-C, configurando um quadro de hiperlipoproteinemia do tipo II. Dessa forma, indivíduos que apresentam os genótipos $\epsilon 4\epsilon 4$ e $\epsilon 3\epsilon 4$ possuem concentrações mais altas de LDL-C, CT e triglicérides e baixos níveis de HDL-C em relação a indivíduos homozigotos $\epsilon 3\epsilon 3$ (FERREIRA, 2010).

Segundo estudo de Schwanke *et al.*, 2002, indivíduos com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ apresentaram um índice de massa corporal médio classificado como sobrepeso, além de uma pressão arterial diastólica mais elevada. Com relação ao perfil lipídico, os resultados demonstraram uma associação entre concentrações maiores de LDL-C com o genótipo $\epsilon 3/\epsilon 4$ (SCHWANKE *et al.*, 2002).

**6 Capítulo 1: Estudo de Associação entre as mutações *C660X* do gene *LDLR*,
R3500Q do gene *APOB* e variantes do gene *APOE* e dislipidemias.**

CAROLINE CARDOZO GASPARIN¹

RICARDO LEHTONEN RODRIGUES DE SOUZA¹

LILIAN PEREIRA FERRARI²

LUPE FURTADO ALLE¹

1 Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Universidade Federal do Paraná – UFPR.

2 Faculdades Integradas do Brasil – Unibrasil.

6.1 INTRODUÇÃO

Os níveis séricos de colesterol são influenciados por diversos fatores, como idade, gênero, hábitos de vida, uso de certos fármacos e fatores genéticos (III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção de Aterosclerose). Muitos genes influenciam os níveis lipêmicos, tais como *LDLR*, *APOE* e *APOB*. As dislipidemias, assim como hábito de fumar, hipertensão, diabetes e obesidade, constituem fatores de risco para Doença Arterial Coronariana (DAC), a qual representa um importante problema de saúde pública (FORD, MOKDAD e AJANI, 2004).

Embora tenha ocorrido uma diminuição da mortalidade por doenças cardiovasculares, a partir da metade da década de 60 nos países mais desenvolvidos, e apenas mais recentemente em países em desenvolvimento, tais enfermidades constituem a principal causa de morte em todo o mundo (HANSSON, 2005).

A mortalidade por DAC é considerada a principal causa de óbito no Brasil, havendo evidências de que altos níveis de colesterol constituam o principal fator de risco modificável com base em estudos tipo caso-controle, observacionais, de base genética ou de tratamento de fator de risco modificável (YUSUF *et al.*, 2004; LEWINGTON *et al.*, 2007; BAIGENT *et al.*, 2010; FERENCÉ *et al.*, 2012; V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose). Dessa forma, torna-se extremamente relevante reduzir os níveis desses lipídios, seja sob a forma de mudança no estilo de vida e/ou utilização de medicamentos (V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose).

A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença genética resultante de mutações no gene que codifica o receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LDLc), o gene *LDLR* (GOLDSTEIN, HOBBS e BROWN, 2001). Como consequências ocorrem um aumento dos níveis de LDL-C e xantomas tendinosos (GOLDSTEIN, HOBBS e BROWN, 2001).

O gene *LDLR* está situado no braço curto do cromossomo 19 (19p13.2), apresentando 18 éxons, 17 íntrons e codifica uma proteína de 839 aminoácidos (CHACRA, SANTOS e MARTINEZ, 2004). A HF é a forma mais comum e também grave de hipercolesterolemia monogênica com transmissão mendeliana e alto risco

cardiovascular (RADER, COHEN e HOBS, 2003). Mais de 900 mutações foram descritas no gene *LDLR* (LAMBERT *et al.*, 2001), sendo a C660X uma das principais já associadas à hipercolesterolemia.

Alguns estudos tem demonstrado que a glicoproteína APOE também desempenha um importante papel no metabolismo, transporte e redistribuição de moléculas que carregam colesterol e outros lipídios (POIRIER, 2005). É sintetizada em vários órgãos, incluindo o fígado, cérebro, baço e rim, e está presente em concentrações elevadas no fluido intersticial, onde participa na redistribuição de colesterol a partir de células com o excesso para aquelas que requerem tal lipídio (MAHLEY, 1988). Participa no *clearance* de quilomícrons remanescentes e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), servindo como um ligante para os receptores de LDL (MAHLEY, INNERARITY e RALL, 1984). É também importante para o absorção intestinal de colesterol (KESANIEMI, EHNHOLM e MIETTINEN, 1987).

A APOE medeia a captação de lipoproteínas (MAHLEY, 1988) e apresenta três principais isoformas codificadas por três alelos do cromossomo 19 – 19q13.2 - ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) (WEISGRABER, RALL e MAHLEY, 1981). Como resultado da substituição de uma timina por citosina em duas posições importantes da região que codifica a APOE, 112 e 158, (SOUZA, ROMANO e WHITTLE, 2005), há substituições únicas de aminoácidos, resultando em 3 isoformas da APOE que possuem a seguinte composição: E2: Cys 112, Cys 158; E3: Cys 112, Arg 158 e E4: Arg 112, Arg 158 (FOLEY, 2005; GREENOW, PEARCE e RAMJI, 2005; HEEREN, BEISIEGEL e GREWAL, 2006)

Na maioria das populações estudadas, o alelo $\epsilon 2$ foi associado com baixos níveis de LDL-C, enquanto que $\epsilon 4$ relaciona-se com altos níveis de LDLc (FRIKKE-SCHMIDT, *et al* 2000; BENNET *et al*, 2007; WARD *et al*, 2009). Além disso, alguns estudos relataram que o alelo $\epsilon 4$ está associado com doenças coronarianas (WILSON, SCHAEFER, LARSON e ORDOVAS, 1996) embora a maioria destes têm sido realizado em indivíduos do gênero masculino.

Há ainda a APOB-100 codificada por um gene situado no braço curto do cromossomo 2 (2p24.1), sendo a R3500Q a primeira mutação identificada e encontrada como a causa de Hipercolesterolemia Tipo B (OMIM 144010) ou *Familial Ligand Defective Apolipoprotein B-100* (BLACKHART *et al*, 1986; INNERARITY *et al*, 1987). Esta é uma doença hereditária autossômica dominante causada por

mutações no gene da APOB que afeta sua ligação com o receptor de LDL-C. (MYANT, 1993). A doença caracteriza-se pelo aumento sérico de colesterol total e LDL-C, além de doença coronariana precoce. Quatro mutações, R3480P, R3500Q (nova nomenclatura R3527Q), R3500W e R3531C são responsáveis pela enfermidade, reduzindo a ligação das partículas de LDL-C ao seu receptor (MYANT, 1993; PULLINGER *et al*, 1995; GAFFNEY *et al*, 1995). A mutação R3500Q leva a substituição de uma CGC por CAC no éxon 26 na posição 1078 do gene APOB, levando à substituição de uma glutamina por arginina na posição 3500. (INNERARITY *et al*, 1987; SORIA *et al*, 1989).

Vista a relevância do assunto, o objetivo foi comparar as frequências alélicas da mutação R3500Q do gene APOB e C660X do gene LDLR e dos polimorfismos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, do gene APOE, entre indivíduos com níveis mais altos e mais baixos de colesterol, visando identificar associação entre as variantes genéticas analisadas e as concentrações lipídicas séricas. O objetivo foi ainda comparar as frequências alélicas dos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene APOE e das mutações R3500Q e C660X com as frequências descritas em diferentes populações.

O projeto foi aprovado em 26 de agosto de 2011 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob o Registro CEP/SD: 1159.084.11.06 e CAAE: 0082.0.091.000-11 (O documento referente a aprovação encontra-se em anexo).

6.2 METODOLOGIA

A amostra foi constituída por 214 adultos (23-65 anos \pm 9,7anos), sendo 30 homens e 184 mulheres, posteriormente classificados em grupos acima e abaixo das medianas de CT, LDL-C, HDL-C e TG. Todos os indivíduos que compõem a amostra são euro-brasileiros residentes da cidade de Curitiba-PR, e foram submetidos a análises bioquímicas, antropométricas e moleculares. A interpretação do lipidograma seguiu a “V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose, 2013”, mostrada na tabela 1. Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TABELA 1: Valores de referência para o perfil lipídico para indivíduos adultos com idade ≥ 20 anos.

Lípides	Valores (mg/dl)	Categoria
CT	< 200	Desejável
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-C	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-C	> 60	Desejável
	< 40	Baixo
TG	<150	Desejável
	150-200	Limítrofe
	200-499	Alto
	≥ 500	Muito alto
Colesterol não-HDL	< 130	Ótimo
	130-159	Desejável
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto

*CT= Colesterol Total; LDL-C= colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-C= colesterol da lipoproteína de alta densidade; TG= triglicerídeos.

Fonte: V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose, 2013.

6.2.1 LIPIDOGRAMA

O lipidograma já havia sido realizado por outros pesquisadores. As amostras sanguíneas foram coletadas no período da manhã, após 12 horas de jejum, para realização de dosagens de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triglicerídeos (TG). As concentrações plasmáticas de CT, TG e de HDL-colesterol foram determinadas em mg/dL, e foi utilizado o teste colorimétrico enzimático (CHOD – PAP; Laboratório Merck, Darmstadt, Alemanha; Laboratório Roche, Indianápolis, IN, EUA). O LDL colesterol foi calculado pela fórmula de Friedewald, em mg/dL.

6.2.2 ANÁLISES MOLECULARES

A extração de DNA já havia sido realizada por outros pesquisadores. O DNA foi extraído de amostras de sangue periférico pelo método de salting-out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) e depois diluído para uma concentração final de 20 ng/μL (TaqMan SNP Genotyping Assay) e 100 ng/μL (PCR-RFLP). Foram investigadas as mutações *C660X* do gene *LDLR*, *R3500Q* do gene *APOB* e as variantes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene *APOE*. As metodologias detalhadas encontram-se nos apêndices.

PCR-RFLP para a mutação *C660X* do GENE *LDLR*

Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizaram-se os primers 5'-GAACTGGTGTGAGAGGACCA-3' e 5'-TGTGAGGCAGCTCCTCATGT-3', destinados à amplificação seletiva de um fragmento de 148 pb do éxon 14 do gene *LDLR*. A PCR seguiu FIGUEIREDO, SANTOS, ALBERTO e ZAGO (1992), com alteração no passo 2: **Passo 1**: 94° C por 3 minutos; **Passo 2**: 35 ciclos, sendo cada um constituído por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C; **Passo 3**: 10 minutos a 72°C e 99 minutos e 59 segundos a 4°C.

Posteriormente, realizou-se digestão enzimática do produto da PCR com a enzima de restrição *Hinfl*, a qual reconhece o sítio de restrição GANTC. Esse sítio é gerado em indivíduos com a mutação *C660X* (rs121908031) do gene *LDLR*, sendo reconhecido pela enzima que cliva o DNA e produz dois fragmentos, um de 51 e outro de 97 pb (FIGUEIREDO, SANTOS, ALBERTO e ZAGO, 1992). Após a digestão enzimática, prosseguiu-se com eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%. A corrida eletroforética se deu em 200V, 35mA e 60W por 130 min. A coloração adotada para o Gel de Poliacrilamida foi a de Nitrato de Prata segundo BUDOWLE, *et al.* 1991.

GENES *APOB* e *APOE*

A mutação *R3500Q* (rs5742904), a mais frequente das mutações do gene *APOB*, e as variantes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene *APOE* (rs7412 – posição 158 - e rs429358 - 112) foram analisadas através de Genotipagem TaqMan.

A genotipagem das variantes foi obtida por *TaqMan SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas no Mastercycler realplex 2 de acordo com os seguintes passos: (1) 50°C/2 min., (2) 95°C/10 min., (3) repetir 50 vezes 95°C/15 seg., intercaladas por 62°C/min.

6.3 RESULTADOS

Das 214 amostras, foram analisadas 72 amostras com alterações no perfil lipídico (CT e/ou, LDL-C e/ou TG aumentados e/ou HDL baixo) para a mutação *C660X*. Nenhuma apresentou a mutação *C660X* do gene *LDLR*. Dessa forma, foi possível excluir a principal causa de HF.

A tabela 2 mostra a descrição estatística (média, desvio padrão, erro padrão, variância, mediana, mínimo e máximo) para as variáveis do estudo nos 214 indivíduos constituintes da amostra.

Analisando-se as médias das variáveis idade e IMC nos grupos acima e abaixo da mediana para LDL-C foi possível verificar que a média da idade foi significativamente maior no grupo acima da mediana de LDL-C ($43,72 \pm 10,26$) do que no grupo abaixo ($40,06 \pm 8,62$; $t=2,672$ e $p=0,0082$). Já a média do IMC foi significativamente maior no grupo abaixo da mediana ($32,54 \pm 7,59$) do que no grupo acima da mediana ($30,61 \pm 5,92$; $t= -2,058$ e $p=0,041$). A média do IMC foi significativamente maior nos grupos HDL-C e CT abaixo da mediana ($32,57 \pm 6,88$ e $32,79 \pm 7,48$, respectivamente) do que no grupo acima da mediana ($30,54 \pm 6,69$, $t= -2,19$, $p=0,03$; $30,40 \pm 5,97$, $t=2,58$ e $p=0,01$). A média do IMC foi significativamente maior no grupo TG acima da mediana ($32,58 \pm 6,26$) do que no grupo abaixo da mediana ($30,56 \pm 7,28$; $t=2,17$ e $p=0,03$).

A tabela 3 mostra a descrição estatística (média, desvio padrão, erro padrão, variância, mediana, mínimo e máximo) da amostra estratificada pela mediana das variáveis CT, LDL-C, HDL-C e TG nos indivíduos constituintes da amostra que foram genotipados para as variantes dos genes *APOB* e *APOE*.

TABELA 2: Estatística descritiva para as variáveis idade, IMC e de perfil lipídico dos 214 indivíduos analisados no presente estudo.

Variável	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Variância	Desvio Padrão	Erro Padrão
IDADE	194	41,90	42	23	65	92,79	9,63	0,69
IMC	214	31,58	31,25	17,9	53,9	46,84	6,84	0,47
HDL-C (mg/dL)	214	51,89	50	26	102	171,69	13,10	0,89
LDL-C (mg/dL)	213	122,64	117,8	46,4	256,8	1136,90	33,72	2,31
TG (mg/dL)	214	136,95	128	32	475	4254,75	65,23	4,46
CT (mg/dL)	214	201,73	202,5	122	345	1456,67	38,17	2,61

TABELA 3: Dados da amostra estratificada: Abaixo da mediana e Acima da mediana das variáveis do estudo para os indivíduos genotipados para as variantes do genes *APOB* e *APOE*.

ABAIXO DA MEDIANA	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Variância	Desvio padrão	Erro padrão
CT (mg/dL)	105	171,14	176	122	202	366,11	19,14	1,87
HDL-C(mg/dL)	109	42,19	43	26	50	30,51	5,52	0,53
LDL-C(mg/dL)	106	95,92	98	46,4	117,8	219,89	14,83	1,44
TG(mg/dL)	106	89,47	91	32	128	445,34	21,10	2,05
ACIMA DA MEDIANA	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Variância	Desvio padrão	Erro padrão
CT (mg/dL)	109	231,21	223	200	345	732,43	27,06	2,59
HDL-C(mg/dL)	105	61,96	59	50	102	118,98	10,91	1,06
LDL-C(mg/dL)	107	149,10	143	111,8	256,8	635,54	25,21	2,44
TG(mg/dL)	108	183,56	161,5	128	475	3607,22	60,06	5,78

A tabela 4 mostra as frequências alélicas e genotípicas para a mutação *R3500Q* do gene *APOB* na amostra total. As tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram as frequências alélicas e genotípicas para a mutação *R3500Q* do gene *APOB* na amostra estratificada pelas medianas de CT, LDL-c, HDL-c e TG, respectivamente. O teste de “Qui-quadrado” foi realizado pelo programa Clump (SHAM e CURTIS, 1995).

TABELA 4: Frequências alélicas e genotípicas para a mutação *R3500Q* (rs5742904), o gene *APOB*.

Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
					95,54±1,00
GG	198	92,96	G	407	
GA	11	5,16	A	19	4,46±1,00
AA	4	1,88			
Total	213	100		426	

* As frequências genotípicas não estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo o $X^2=11,95$ e $p=0,0005$

**Para as variáveis CT e LDL-C acima da mediana, assim como, HDL-C abaixo da mediana, observaram-se frequências genotípicas fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg com valores de X^2 e p respectivamente: $X^2=16,15$ e $p=0,0011$; $X^2=15,8$ e $p=0,012$; $X^2=8,39$ e $p=0,039$. As demais frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio, sendo: CT abaixo da mediana $X^2=1,48$ e $p=0,22$; LDL-C abaixo da mediana $X^2=1,51$ e $p=0,21$; HDL-C acima da mediana $X^2=1,98$ e $p=0,37$; TG acima da mediana $X^2=2,72$ e $p=0,0991$; TG abaixo da mediana $X^2=3,78$ e $p=0,15$.

TABELA 5: Frequências alélicas e genotípicas da mutação *R3500Q* do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do CT.

Abaixo da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	103	96,26	G	209	97,66±1,03
GA	3	2,80	A	5	2,34±1,03
AA	1	0,94			
Total	107	100		214	
Acima da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	96	89,72	G	200	93,46±1,69
GA	8	7,48	A	14	6,54±1,69
AA	3	2,80			
Total	107	100		214	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre as frequências alélicas para os grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana”, havendo diferença significativa entre essas frequências, sendo a frequência da mutação maior no grupo acima da mediana ($X^2 = 4,46$, $p=0,034$). Realizou-se ainda o teste “Qui-quadrado” entre portadores (AA e GA) e usuais (GG) para os mesmos grupos, resultando em uma tendência a uma maior frequência de portadores no grupo acima da mediana ($X^2 = 3,51$, $p=0,061$).

Análise de regressão logística múltipla, usando como variável dependente CT e variáveis independentes a alteração *R3500Q*, gênero e idade para os grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana” mostrou que o polimorfismo *R3500Q* do gene *APOB* é um fator de risco independente para aumento dos níveis de CT ($\beta=21,326 \pm 10377,78$, $\text{Sig}=0,001$).

TABELA 6: Frequências alélicas e genotípicas da mutação *R3500Q* do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do LDL-C.

Abaixo da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	100	94,34	G	205	96,7±1,23
GA	5	4,72	A	7	33±1,23
AA	1	0,94			
Total	106	100		212	
Acima da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	97	91,51	G	200	94,34±1,59
GA	6	5,66	A	12	5,66±1,59
AA	3	2,83			
Total	106	100		212	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre as frequências alélicas para os grupos “LDL-C abaixo da mediana” e “LDL-C acima da mediana”, não havendo diferença significativa entre essas frequências ($X^2 = 1,38$, $p=0,24$). Realizou-se ainda o teste “Qui-quadrado” entre portadores (AA e GA) e usuais (GG) para os mesmos grupos, não existindo diferenças significativas nas frequências de portadores e usuais ($X^2 = 0,64$, $p=0,42$).

TABELA 7: Frequências alélicas e genotípicas da mutação *R3500Q* do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do HDL-C.

Abaixo da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	105	92,92	G	216	95,58±1,37
GA	6	5,31	A	10	4,42±1,37
AA	2	1,77			
Total	113	100		226	
Acima da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	94	93,07	G	193	95,54±1,45
GA	5	4,95	A	9	4,46±1,45
AA	2	1,98			
Total	101	100		202	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre as frequências alélicas para os grupos “HDL-C abaixo da mediana” e “HDL-C acima da mediana”, não havendo diferença significativa entre essas frequências ($X^2 = 0,000236$, $p=0,9877$). Realizou-se ainda o teste “Qui-quadrado” entre portadores (AA e GA) e usuais (GG) para os mesmos grupos, não existindo diferenças significativas nas frequências de portadores e usuais ($X^2 = 0,001815$, $p=0,9660$).

TABELA 8: Frequências alélicas e genotípicas da mutação R3500Q do gene *APOB* na amostra estratificada pela mediana do TG.

Abaixo da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	102	94,44	G	207	95,83±1,36
GA	3	2,78	A	9	4,17±1,36
AA	3	2,78			
Total	108	100		216	
Acima da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
GG	97	91,51	G	202	95,28±1,456
GA	8	7,55	A	10	4,72±1,456
AA	1	0,94			
Total	106	100		212	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre as frequências alélicas para os grupos “TG abaixo da mediana” e “TG acima da mediana”, não havendo diferença significativa entre essas frequências ($X^2 = 0,076$, $p=0,7828$). Realizou-se ainda o teste “Qui-quadrado” entre portadores (AA e GA) e usuais (GG) para os mesmos grupos, não existindo diferenças significativas nas frequências de portadores e usuais ($X^2 = 0,707$, $p=0,4004$).

As tabelas a seguir referem-se às frequências alélicas e genotípicas para o gene APOE de **todos** os indivíduos (tabela 9) e da **amostra estratificada** em grupos acima e abaixo da mediana para as variáveis CT, LDL-C, HDL-C e TG. (tabelas 10, 11, 12 e 13, respectivamente)

TABELA 9: Frequências alélicas e genotípicas de todos os indivíduos genotipados para o gene APOE.

Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	3	1,5	$\epsilon 2$	37	9,25 \pm 0,4625
$\epsilon 2\epsilon 4$	6	3	$\epsilon 3$	282	70,5 \pm 3,525
$\epsilon 2\epsilon 3$	25	12,5			
$\epsilon 4\epsilon 4$	14	7	$\epsilon 4$	81	20,25 \pm 1,401
$\epsilon 3\epsilon 4$	47	23,5			
$\epsilon 3\epsilon 3$	105	52,5			
Total	200	100		400	

* As frequências genotípicas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo o $X^2=4,46$ e $p=0,217$

**Para as variáveis CT e LDL-C e TG acima da mediana observaram-se frequências genotípicas fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg com valores de X^2 e p respectivamente: $X^2=20,42$ e $p=0,0001$; $X^2=13,9$ e $p=0,003$; $X^2=18,94$ e $p=0,0003$. As demais frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio, sendo: CT abaixo da mediana $X^2=0,052$ e $p=0,9969$; LDL-C abaixo da mediana $X^2=2,50$ e $p=0,4753$; TG abaixo da mediana $X^2=1,91$ e $p=0,5913$; HDL-C abaixo da mediana $X^2=5,92$ e $p=0,1156$; HDL-C acima da mediana $X^2=2,81$ e $p=0,4219$.

TABELA 10: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do CT.

Acima da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	0	0	$\epsilon 2$	14	$7 \pm 1,80$
$\epsilon 2\epsilon 4$	4	4			
$\epsilon 2\epsilon 3$	10	10	$\epsilon 3$	133	$66,5 \pm 3,34$
$\epsilon 4\epsilon 4$	7	7			
$\epsilon 3\epsilon 4$	35	35	$\epsilon 4$	53	$26,5 \pm 3,12$
$\epsilon 3\epsilon 3$	44	44			
Total	100	100		200	

Abaixo da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	3	3	$\epsilon 2$	23	$11,5 \pm 2,26$
$\epsilon 2\epsilon 4$	2	2			
$\epsilon 2\epsilon 3$	15	15	$\epsilon 3$	147	$73,5 \pm 3,12$
$\epsilon 4\epsilon 4$	7	7			
$\epsilon 3\epsilon 4$	14	14	$\epsilon 4$	30	$15 \pm 2,52$
$\epsilon 3\epsilon 3$	59	59			
Total	100	100		200	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre a frequências alélicas abaixo e acima da mediana, e apenas para o alelo $\epsilon 4$ entre os grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana”, foi verificada diferença significativa, sendo a frequência do alelo $\epsilon 4$ maior no grupo acima da mediana ($X^2 = 5,29$, $p = 0,021$). Realizou-se ainda o “Teste G” para comparar as proporções genotípicas nesses mesmos grupos, e a diferença foi significativa (Teste-G=17,33 e $p = 0,0039$).

TABELA 11: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do LDL-C.

Acima da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	0	0	$\epsilon 2$	18	8,74 \pm 1,97
$\epsilon 2\epsilon 4$	5	4,85			
$\epsilon 2\epsilon 3$	13	12,62	$\epsilon 3$	130	63,1 \pm 3,36
$\epsilon 4\epsilon 4$	11	10,68			
$\epsilon 3\epsilon 4$	31	30,1	$\epsilon 4$	58	28,16 \pm 3,13
$\epsilon 3\epsilon 3$	43	41,75			
Total	103	100		206	

Abaixo da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	3	3,09	$\epsilon 2$	19	9,79 \pm 2,13
$\epsilon 2\epsilon 4$	1	1,03			
$\epsilon 2\epsilon 3$	12	12,37	$\epsilon 3$	150	77,32 \pm 3,01

TABELA 11: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do LDL-C.

continuação e conclusão

ε3ε4	18	18,56	ε4		
ε3ε3	60	61,86			
Total	97	100		194	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” para comparar as frequências alélicas dos grupos acima e abaixo da mediana de LDL-C. Apenas para o alelo ε4 foi verificada diferença significativa entre essas frequências, sendo a frequência do alelo ε4 maior no grupo acima da mediana ($X^2 = 9,36$, $p = 0,0022$). Realizou-se ainda o “Teste G” para comparar as proporções genotípicas nesses mesmos grupos, e a diferença foi significativa (Teste-G=18,09 e $p = 0,0028$).

TABELA 12: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do HDL-C.

Abaixo da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% ± EP
ε2ε2	0	0	ε2	12	6±1,68
ε2ε4	0	0	ε3	139	69,5±3,26
ε2ε3	12	12			
ε4ε4	10	10	ε4	49	24,5±3,04
ε3ε4	29	29			
ε3ε3	49	49			
Total	100	100		200	

TABELA 12: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do HDL-C.

continuação e conclusão

Acima da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	3	3	$\epsilon 2$	25	12,5 \pm 2,34
$\epsilon 2\epsilon 4$	6	6	$\epsilon 3$	141	70,5 \pm 3,22
$\epsilon 2\epsilon 3$	13	13			
$\epsilon 4\epsilon 4$	4	4	$\epsilon 4$	34	17 \pm 2,66
$\epsilon 3\epsilon 4$	20	20			
$\epsilon 3\epsilon 3$	54	54			
Total	100	100		200	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” para comparar as frequências alélicas entre os grupos “HDL-C abaixo da mediana” e “HDL-C acima da mediana”, havendo diferença significativa entre essas frequências somente para o alelo $\epsilon 2$, sendo a frequência do alelo $\epsilon 2$ maior no grupo acima da mediana ($X^2 = 4,10$, $p = 0,0429$). Realizou-se ainda o “Teste G” para comparar as proporções genotípicas nesses mesmos grupos, e a diferença foi significativa (Teste-G=17,08 e $p = 0,0044$).

TABELA 13: Frequências alélicas e genotípicas para o gene *APOE* na amostra estratificada pela mediana do TG.

Abaixo da mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	0	0	$\epsilon 2$	17	8,85 \pm 2,05
$\epsilon 2\epsilon 4$	5	5,21	$\epsilon 3$	139	72,4 \pm 3,23
$\epsilon 2\epsilon 3$	12	12,5			
$\epsilon 4\epsilon 4$	1	1,04	$\epsilon 4$	36	18,75 \pm 2,82
$\epsilon 3\epsilon 4$	29	30,21			
$\epsilon 3\epsilon 3$	49	51,04			
Total	96	100		192	

Acima da Mediana					
Genótipo	N	%	Alelos	N	% \pm EP
$\epsilon 2\epsilon 2$	3	2,88	$\epsilon 2$	20	9,61 \pm 2,04
$\epsilon 2\epsilon 4$	1	0,96	$\epsilon 3$	141	67,79 \pm 3,24
$\epsilon 2\epsilon 3$	13	12,5			
$\epsilon 4\epsilon 4$	13	12,5	$\epsilon 4$	47	22,6 \pm 2,9
$\epsilon 3\epsilon 4$	20	19,23			
$\epsilon 3\epsilon 3$	54	51,92			
Total	104	100		208	

Realizou-se o teste “Qui-quadrado” entre as frequências alélicas para os grupos “TG abaixo da mediana” e “TG acima da mediana”, não havendo diferença

significativa entre essas frequências. Realizou-se ainda o “Teste G” para comparar as proporções genótípicas nesses mesmos grupos, e a diferença foi significativa (Teste-G=20,90 e $p = 0,0008$).

As figuras a seguir ilustram as frequências genótípicas nos grupos acima e abaixo da mediana para as variáveis do perfil lipídico.

Na tabela 14 é apresentada a estatística descritiva da idade e das variáveis do perfil lipídico para os indivíduos agrupados por genótipo do gene *APOE*.

FIGURA 1: Frequências genótípicas nos grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana” para o gene *APOE*.

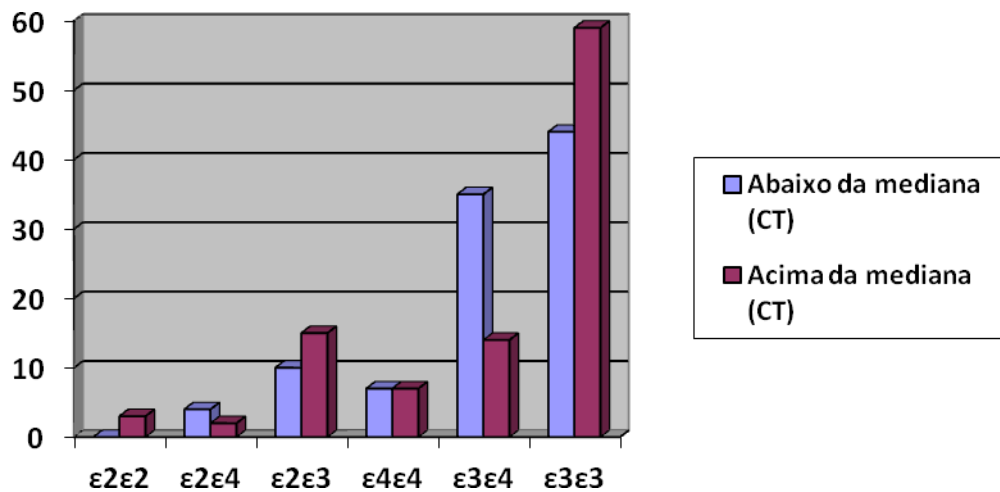


FIGURA 2: Frequências genótípicas nos grupos “LDL-C abaixo da mediana” e “LDL-C acima da mediana” para o gene *APOE*.

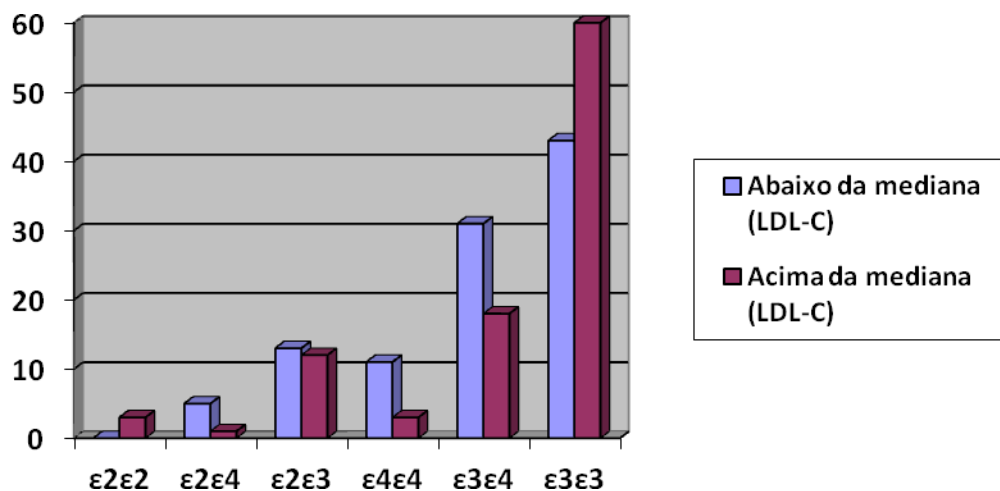


FIGURA 3: Frequências genotípicas nos grupos “HDL-C abaixo da mediana” e “HDL-C acima da mediana” para o gene *APOE*.

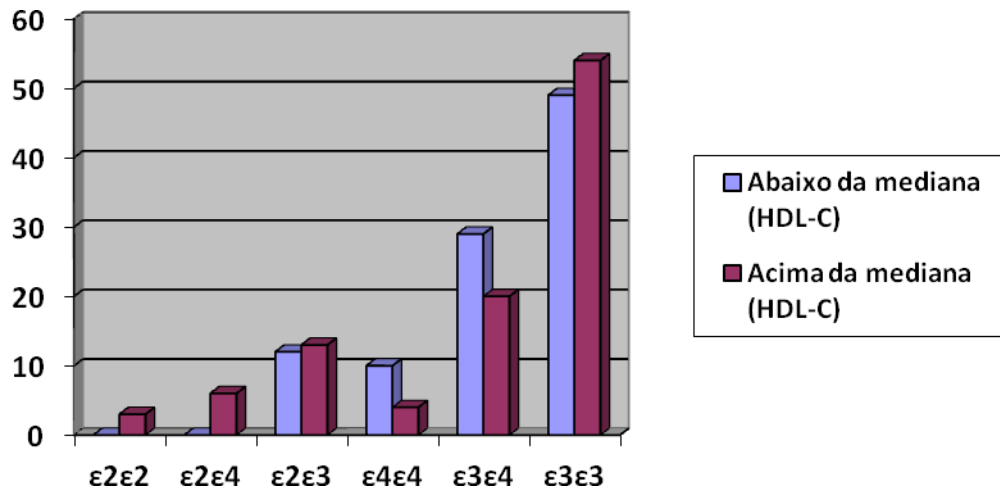


FIGURA 4: Frequências genotípicas nos grupos “TG abaixo da mediana” e “TG acima da mediana” para o gene *APOE*.

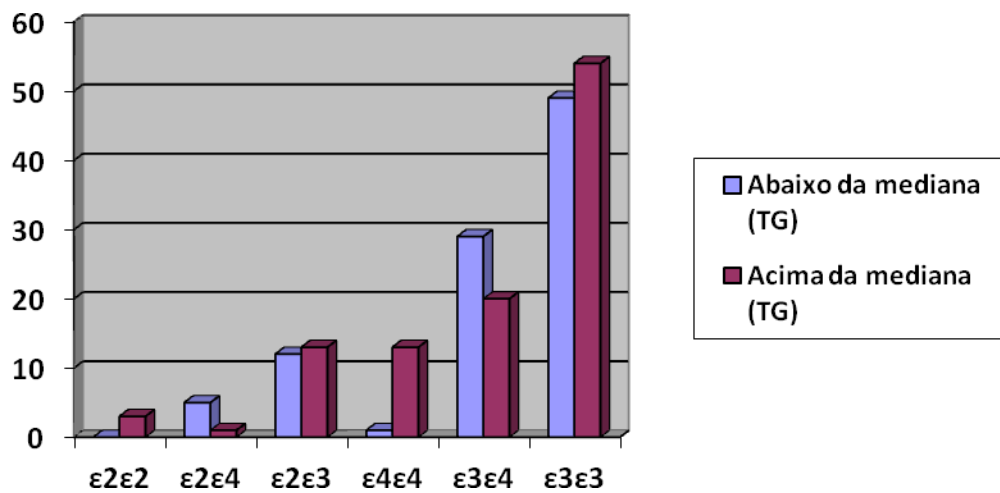


TABELA 14: Estatística descritiva (N, média, mínimo, máximo e desvio padrão) das variáveis do estudo nos indivíduos agrupados por genótipo do gene *APOE*.

ε2 ε2	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	2	37,5	37	38	0,71
CT	3	240,67	227	251	12,34
HDL	3	55,67	55	57	1,16
LDL	3	155,13	138,4	166,2	14,74
TG	3	149,33	139	168	16,20
ε2 ε3	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	23	42,22	20	61	12,07
CT	25	201,56	133	248	31,70
HDL	25	51,2	35	78	11,50
LDL	25	120,2	66,2	167	26,28
TG	25	150,44	61	266	66,35
ε2 ε4	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	6	48,67	38	60	7,20
CT	6	182,67	143	217	26,46
HDL	6	63,83	56	82	9,52
LDL	6	98,9	75	133,2	21,18
TG	6	99,67	42	190	50,25
ε3 ε3	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	90	42,1	23	65	9,90
CT	103	208,01	127	345	40,94
HDL	103	51,77	26	96	13,26
LDL	103	128,96	46,4	256,8	36,68
TG	103	138,73	32	475	71,75
ε3 ε4	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	43	41,51	25	60	8,78
CT	49	186,90	135	264	30,36
HDL	49	50,86	31	102	14,37
LDL	49	111,82	72	182,2	25,40
TG	49	121	48	251	44,02

TABELA 14: Estatística descritiva (N, média, mínimo, máximo e desvio padrão) das variáveis do estudo nos indivíduos agrupados por genótipo do gene *APOE*.

continuação e conclusão

ε4 ε4	N	MÉDIA	MÍNIMO	MÁXIMO	DESVIO PADRÃO
IDADE	12	39,08	31	55	6,708
CT	14	202,5	122	293	54,88
HDL	14	48,64	30	91	14,65
LDL	13	115,97	60,2	198	45,44
TG	14	179,71	66	420	79,33

6.4 DISCUSSÃO

É possível notar que antes e após a estratificação das amostras para o gene *APOB*, os grupos total, CT e LDL-C acima da mediana e HDL-C abaixo da mediana permaneceram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Visto que em todas as placas foram utilizados controles para ambos os homozigotos, heterozigotos e controles negativos, além das genotipagens terem sido conferidas por duas pesquisadoras independentemente, excluimos a possibilidade de erro técnico. Provavelmente a amostra total e com níveis lipídicos mais altos estão em desequilíbrio devido a mutação estar associada a dislipidemias e a amostra total, assim como esses estratos, possuir uma parte significativa de indivíduos dislipidêmicos – e esse pode ter sido o fator evolutivo a tirar a amostra do equilíbrio. Já nos grupos com níveis lipídicos menores o equilíbrio é restaurado, e o alelo mutante não se encontra em um grupo favorável a seu aparecimento, dessa forma os estratos permanecem em equilíbrio.

Em relação à mutação *R3500Q* do gene *APOB*, as frequências alélicas e de portadores variam muito entre uma população e outra, não havendo muitos dados sobre a população brasileira. Comparando-se as frequências alélicas do presente trabalho com as de outros, constatou-se o seguinte: as frequências encontradas (G=0,9554; A=0,0446) foram diferentes das frequências observadas por NELKEN *et al.*, 2008, que realizaram um pesquisa com pacientes do Canadá (G=0,98855; A=0,01145), sendo o $\chi^2=17,15882$ e $p<0,0001$. As frequências também foram

diferentes das do trabalho de FARD-ESFAHANI *et al.*, 2005, e de AWAD e EL-TARRAS, 2011, os quais analisaram, respectivamente, 130 pacientes iranianos e 200 indivíduos da Arábia Saudita, e não observaram a mutação ($X^2=20,93293$ e $p<0,0001$). As frequências entre portadores e usuais da pesquisa de HORVATH *et al.*, 2001, em indivíduos búlgaros, também diferiram estatisticamente das nossas, sendo o valor de $X^2=9,6$ e $p=0,0019$. SHEN *et al.*, 2010, realizaram uma pesquisa com indivíduos da “Older Order Amish” residentes da Pensilvânia, os quais apresentaram uma alta frequência de portadores da *R3500Q* condizente com a cultura endogâmica deles, no entanto as frequências foram novamente distintas das nossas com $X^2=6,394$ e $p=0,0115$.

Por meio da análise das frequências alélicas entre os grupos “CT abaixo da mediana” e “CT acima da mediana”, observou-se uma diferença estatisticamente significativa, sendo a frequência da mutação maior no grupo acima da mediana. Comparando-se as frequências de portadores e usuais nesses mesmos grupos foi possível observar uma tendência a haver mais portadores no grupo acima da mediana. Tais resultados foram confirmados por regressão logística múltipla, a qual demonstrou que o polimorfismo *R3500Q* é um fator de risco, independente de idade e gênero, para altos níveis de Colesterol Total. A verificação da independência em relação aos fatores analisados é relevante, pois sabe-se que a colesterolemia é influenciada por fatores ligados à idade e ao gênero. A frequência do alelo mutante foi significativamente maior no grupo CT acima da mediana, justamente por se associar a dislipidemias e, dessa forma, seu estudo é de grande relevância na área de saúde pública, já que as dislipidemias estão envolvidas com a principal causa de morte no mundo, a DAC (HANSSON, 2005). O polimorfismo *R3500Q* interfere na conformação do domínio de ligação da APOB 100 com o receptor B/E, de modo a reduzir a afinidade da LDL-C (lipoproteína de baixa densidade) por esse receptor, aumentando assim os níveis séricos de LDL-C e de colesterol total (MYANT, 1993; GAFFNEY *et al.*, 2002; PULLINGER *et al.*, 1995; GAFFNEY *et al.*, 1995).

A análise de regressão logística não foi realizada para os outros grupos devido às frequências alélicas, de portadores e usuais, nos diferentes grupos acima e abaixo da mediana terem sido semelhantes.

Com relação ao gene *APOE* as frequências alélicas também variam muito entre uma população e outra. Comparando-se as frequências alélicas do presente trabalho ($\epsilon_2=0,0925$, $\epsilon_3=0,705$, $\epsilon_4=0,2025$) com as de outras pesquisas constatou-se

o seguinte: nossas frequências alélicas diferem das frequências encontradas por GUAN *et al.*, 2012, em seu trabalho realizado com idosos na China ($X^2=8,56$ e $p=0,0138$). Diferem também das encontradas por ALVIM *et al.*, 2010, em seu trabalho realizado no Espírito Santo, Brasil ($X^2=7,55$ e $p=0,0229$) e por SCHWANKE *et al.*, 2002, em seu trabalho realizado com idosos no Rio Grande do Sul, Brasil ($X^2=9,55$ e $p=0,0084$). Divergem ainda das frequências encontradas por ANUURAD, 2006, tanto dos pacientes afro-americanos ($X^2=7,06$ e $p=0,0293$) quanto euro-descendentes ($X^2=8,16$ e $p=0,0169$) que foram recrutados em Nova Iorque, e por MAHFOUZ, *et al.*, 2013, em seu trabalho realizado com libaneses ($X^2=9,79$ e $p=0,0075$). Por último nossas frequências alélicas diferem das frequências encontradas por ZELJKO, *et al.*, 2011, em seu trabalho realizado com uma comunidade cigana de origem indiana e que reside na Croácia ($X^2=8,26$ e $p=0,0161$).

Embora na amostra total os genótipos do gene *APOE* estivessem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, observou-se que após a estratificação das amostras os grupos CT, LDL-C e TG acima da mediana se encontraram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Provavelmente houve um maior percentual de portadores do alelo $\epsilon 4$ nesses grupos, após a estratificação, e esse pode ter sido o fator evolutivo a tirar a amostra do equilíbrio. A substituição de uma Timina por Citosina em duas importantes posições (112 e 158) do gene *APOE*, produz substituição de aminoácidos e leva a polimorfismos genéticos nesse gene. As três principais isoformas E2, E3 e E4, geradas respectivamente pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, apresentam a seguinte composição: E2 – Cys 112, Cys 158; E3 - Cys 112, Arg 158; E4 – Arg 112, Arg 158 (FOHLEY, 2005; GREENOW *et al.*, 2005; HEEREN *et al.*, 2006). Tais diferenças na composição levam a diferentes afinidades de ligação aos receptores específicos (ZHANG *et al.*, 2007). A isoforma *APOE4* possui uma alteração conformacional na sua estrutura, resultando em uma elevada afinidade de ligação aos receptores de LDL-C (SOUZA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Ocorre uma rápida remoção plasmática de VLDL (Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa), IDL (Lipoproteínas de Densidade Intermediária) e quilomícrons, levando a um mecanismo de *feedback* que gera uma resposta hepática de redução de expressão de receptores de LDL-C, culminando em níveis séricos elevados de LDL-C (GREENOW *et al.*, 2005; TOPIC *et al.*, 2008). De fato, espera-se uma frequência maior do alelo $\epsilon 4$ na maioria dos grupos acima da mediana, pois este é considerado

um fator de risco para aumentos nos níveis de LDL-C e DAC, enquanto o alelo $\epsilon 2$ está relacionado a concentrações mais baixas de LDL-C (FRIKKE-SCHMIDT *et al*, 2000; BENNET *et al*, 2007; WARD *et al*, 2009). A frequência do alelo $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ foram significativamente diferentes nos grupos acima e abaixo da mediana para as variáveis CT, LDL-C e HDL-C. A frequência de $\epsilon 4$ foi maior nos estratos CT e LDL-C acima da mediana, e a do alelo $\epsilon 2$ foi maior em HDL acima da mediana, corroborando, portanto, com o que é descrito nas literaturas (FRIKKE-SCHMIDT, *et al* 2000; BENNET *et al*, 2007; WARD *et al*, 2009). Novamente o alelo $\epsilon 4$ foi mais frequente em indivíduos com níveis mais altos de CT e LDL-C por associar-se a dislipidemias, enquanto que o alelo $\epsilon 2$ foi mais frequente em indivíduos com concentrações mais elevadas de HDL-C, constituindo um efeito protetor, já que uma das funções dessa lipoproteína é a de remover o excesso de LDL-C da circulação. Assim, estudos envolvendo os alelos $\epsilon 2$ e $\epsilon 4$ apresentam uma grande importância nas áreas de saúde pública. Três alelos do gene *APOE* ocorrem de maneira mais comum, sendo eles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ e codificam as três principais isoformas de *APOE*: E2 (cisteína/cisteína), E3 (cisteína/arginina) e E4 (arginina/arginina), respectivamente (FERREIRA, 2010 e SCHWANKE *et al.*, 2002). As isoformas de *APOE* são diferenciadas entre si pelo conteúdo de cisteína e arginina nas posições dos códons 112 e 158 do éxon 4 (SOUZA *et al.*, 1998).

Altos níveis de LDL-C e de CT foram observados, em ordem decrescente, nos seguintes fenótipos: E2/3 < E3/3 < E4/3 < E4/4. A alta frequência do alelo $\epsilon 4$ tem sido associada à elevação na concentração de triglicerídeos e diminuição de HDL-C. No entanto, o efeito dos polimorfismos da *APOE* sobre os níveis plasmáticos de lipídeos é variável nas diferentes populações e regiões (SOUZA *et al.*, 2007).

6.5 CONCLUSÃO

Nenhum dos 72 indivíduos com dislipidemias apresentou a mutação C660X do gene *LDLR*, dessa forma é possível excluir uma das principais causas de Hipercolesterolemia Familiar. No entanto, observou-se que a mutação R3500Q do gene *APOB* constitui um importante fator de risco para altos níveis de Colesterol Total. Já o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* foi significativamente mais frequente em

indivíduos com níveis mais altos de CT e LDL-C, enquanto que o alelo $\epsilon 2$ foi significativamente mais frequente em indivíduos com níveis mais altos de HDL-C. As frequências alélicas dos genes *APOB* e *APOE* variam muito entre as diferentes populações.

6.6 REFERÊNCIAS

ALVIM R. O. *et al.* APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. **Lipids in Health and Disease**. v. 9, p. 1-7, 2010.

ANUURAD E. *et al.* Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. **Journal of Lipid Research**. v. 47, p. 2475-2481, 2006.

AWAD N. S.; EL-TARRAS A. E. Analysis of the APO B R3500Q Mutation and APOE Polymorphism in Taif Saudi Population using Polymerase Chain Reaction- Reverses Hybridization Technique. **J. Mol. Biomark Diagn**. v. 2, p. 1-4, 2011.

BAIGENT C. *et al.* Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. **Lancet**. v. 376, p. 1670–1681, 2010.

BENNET A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk American Medical Association. **JAMA**. v. 298, n.11, p. 1300-1311, 2007.

BLACKHART B. *et al.* Structure of the human apolipoprotein B gene. **J. Biol. Chem**. v. 261, n. 33, p. 15364-15367, 1986.

BUDOWLE B. *et al.* Analysis of the VNTR locus dis80 by the pcr followed by high-resolution page **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 48, p. 137-144, 1991.

CHACRA A. P. M.; SANTOS R. D.; MARTINEZ . L .R. Hipercolesterolemia Familiar. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**. v. 14, n.3, p. 462-475, 2004.

FARD-ESFAHANI P. *et al.* Familial defective apolipoprotein B 100: frequency of R3500Q mutation of apolipoprotein B gene in iranian hypercholesterolemic patients. **Acta Medica Iranica**. v. 43, n. 3, p. 193-196, 2005.

ERENCE B. A. *et al.* Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 60, n. 25, p. 2631-2639, 2012.

FIGUEIREDO M. S.; SANTOS J. E. D.; ALBERTO F. L.; ZAGO M. A. High frequency of the lebanese allele of the LDLR gene among brazilian patients with familial hypercholesterolaemia. **J. Med. Genet.** v. 29, p. 813-815, 1992.

FOLEY, S. M. Update on risk factors for atherosclerosis: the role of inflammation and apolipoprotein E. **Medsurg Nursing**. v. 14, n. 1, p. 43-50, 2005.

FORD E. S.; MOKDAD A. H.; AJANI U. A. Trends in risk factors for cardiovascular disease among children and adolescents in the United States. **Pediatrics**. v. 114, p. 1534-1544, 2004.

FRIKKE-SCHMIDT R. *et al.* Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. **J. Lipid. Res.** v. 41, p. 1812-1822, 2000.

GAFFNEY D. *et al.* Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidaemia. **Arterioscle Thromb. Vasc. Biol.** v. 15, p. 1025-1029, 1995.

GAFFNEY D. *et al.* Influence of an asparagine to lysine mutation at aminoacid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding. **Clin. Chem. Acta.** v. 321, p. 113-121, 2002.

GOLDSTEIN J. L.; HOBBS H. H.; BROWN M. S. Familial hypercholesterolemia In: Scriver CR ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. **New York: McGraw Hill.** p. 2863-2913, 2001.

GREENOW K.; PEARCE N. J.; RAMJI D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **J. Mol. Med.** v. 83, p. 329-342, 2005.

GUAN S. *et al.* The relationship between apolipoprotein (apo) E polymorphism and lipid changes: An 8-year cohort study in Beijing elderly persons. **Archives of Gerontology and Geriatrics.** v. 55, p. 713-717, 2012.

HANSSON G. K. Mechanisms of disease inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.** v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HEEREN J.; BEISIEGEL U.; GREWAL T. Apolipoprotein E recycling. Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.** v. 26, p. 442-448, 2006.

HORVATH A. *et al.* High frequency of the ApoB-100 R3500Q mutation in Bulgarian hypercholesterolaemic subjects. **J. Med. Genet.** v. 38, p. 536-540, 2001.

INNERARITY T. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 84, p. 6919-6923, 1987.

KESANIEMI Y. A.; EHNHOLM C.; MIETTINEN T. A. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. **J. Clin. Invest.** v. 80, n. 2, p. 578-581, 1987.

LAHIRI D. K.; NURNBERGER J. R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research.** v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAMBERT M. *et al.* Determinants of lipid level variability in French-Canadian children with familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 21, n. 6, p. 979-984, 2001.

LEWINGTON S. *et al.* Prospective Studies Collaboration. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. **Lancet.** v. 370, n. 9602, p. 1829-1839, 2007.

MAHFOUZ R. A. *et al.*, Apolipoprotein E gene polymorphisms in Lebanese with hypercholesterolemia. **Gene.** v. 522, p. 84-88, 2013.

MAHLEY R. W.; INNERARITY T. L.; RALL S. C. Jr.; WEISGRABER K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **J. Lipid. Res.** v. 25, n. 12, p. 1277-1294, 1984.

MAHLEY R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science.** v. 240, p. 622-630, 1988.

MYANT N. B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparison with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis.** v. 104, p. 1-18, 1993.

NELKEN J. *et al.* Detection of familial defective apoB (FDB) mutations in hypercholesterolemic children and adolescents by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). **Clinical Biochemistry**. v. 41, p. 395-399, 2008.

POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**. v. 26, p. 355-361, 2005.

PULLINGER C. R. *et al.* Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. **J. Clin. Invest.** v. 95, p. 1225-1234, 1995.

RADER D. J.; COHEN J.; HOBS H. Monogenic Hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. **J. Clin. Invest.** v. 111, n. 12, p. 1795-1803, 2003.

SANTOS, R. D *et al.* III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção de Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** Suplemento III, 2001.

SCHWANKE C. H. A. *et al.*, Análise da Associação entre Polimorfismo do Gene da Apolipoproteína E e Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos Longevos. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 78, n. 6, p. 561-570, 2002.

SHEN H. *et al.* Familial Defective Apolipoprotein B-100 and Increased Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Calcification in the Old Order Amish. **Arch. Intern. Med.** v. 170, n. 20, p. 1850-1855, 2010.

SHAM P. C.; CURTIS D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Ann. Hum. Genet.** v. 59, p. 97-105. 1995.

SORIA L. F. *et al.* Association between a specific Apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B100. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 86, p. 587-591, 1989.

SOUZA G. M. A.; ROMANO N. L.; WHITTLE M. R. Efficient mispriming during apolipoprotein E genotyping. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 41, n. 1, p. 25-28, 2005.

SOUZA, D. R. S. *et al.*, Relevance of apolipoprotein E4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 40, n. 2, p. 189-197, 2007.

TOPIC, A. *et al.*, Genderrelated effect of apo E polymorphism on lipoprotein particle sizes in the middle-aged subjects. **Clinical Biochemistry.** v. 41, p. 361-367, 2008.

WARD H. *et al.* APOE genotype, lipids, and coronary heart disease risk. **Arch. Intern. Med.** v. 69, p. 1424-1429, 2009.

WEISGRABER K. H.; RALL S. C. Jr; MAHLEY R. W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. **J. Biol. Chem.** v. 256, p. 9077-9083, 1981.

WILSON P. W.; SCHAEFER E. J.; LARSON M. G.; ORDOVAS J. M. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 16, n. 10, p. 1250-1255, 1996.

YUSUF S. *et al.* INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet.** v. 364, n. 9438, p. 937-952, 2004.

XAVIER H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 101, n. 4, suplemento 1, 2013.

ZELJKO H. M. *et al.* E2 allele of the Apolipoprotein E gene polymorphism is predictive for obesity status in Roma minority population of Croatia. **Lipids in Health and Disease.** v. 10, n. 9, p. 1-5, 2011.

ZHANG Y. *et al.*, A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E. **Biochemistry**. v. 46, p.10722-10732, 2007.

7. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo investigou a associação entre as mutações C660X do gene *LDLR*, R3500Q do gene *APOB* e das variantes $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$ do gene *APOE* a dislipidemias.

Nenhum dos 72 indivíduos com dislipidemias apresentou a mutação C660X, dessa forma foi possível excluir a principal causa de Hipercolesterolemia Familiar.

Dados descritos nas literaturas demonstram que a mutação R3500Q leva a um aumento sérico de colesterol total e LDL-C, assim, seu estudo tem grande relevância na área de saúde pública, já que as dislipidemias estão fortemente associadas a DAC, uma das principais causas de morte em todo o mundo (FORD, MOKDAD e AJANI, 2004; MYANT, 1993; PULLINGER *et al*, 1995; GAFFNEY *et al*, 1995, HANSSON, 2005). Há poucos dados dessa mutação na população brasileira, e nossos resultados demonstraram que tal alteração genética apresentou uma associação significativa com altos níveis de CT. Esse achado foi confirmado por regressão logística múltipla, demonstrando que a mutação é um fator de risco, independente de idade e gênero, para altos níveis de Colesterol Total.

As frequências alélicas do gene *APOB* variam muito entre as populações, e nossas frequências alélicas ou de portadores foram significativamente diferentes das frequências encontradas por NELKEN *et al.*, 2008 ($X^2=17,15882$ e $p<0,0001$), FARD-ESFAHANI *et al.*, 2005 e AWAD e EL-TARRAS, 2011 ($X^2=20,93293$ e $p<0,0001$), HORVATH *et al.*, 2001 ($X^2=9,6$ e $p=0,0019$) e SHEN *et al.*, 2010 ($X^2=6,394$ e $p=0,0115$).

Com relação ao gene *APOE*, na maioria das populações o alelo $\epsilon 2$ foi associado com baixos níveis de LDL-C e o $\epsilon 4$ a altos níveis de LDL-C (FRIKKE-SCHMIDT, *et al* 2000; BENNET *et al*, 2007; WARD *et al*, 2009). Nossos dados demonstraram uma associação significativa entre o alelo $\epsilon 4$ e níveis mais altos de CT e LDL-C. Já o alelo $\epsilon 2$ foi associado a altos níveis de HDL-C, e visto que tais lipoproteínas removem o excesso de LDL-C da circulação, nossos dados

corroboram com o que é descrito. Dessa forma, o alelo $\epsilon 4$ e $\epsilon 2$ também representam um assunto importante na área de saúde pública, o primeiro relacionado a aumentos nos níveis de CT e LDL-C e o segundo como tendo um efeito protetor a tais alterações.

As frequências alélicas dos alelos do gene *APOE* também diferiram significativamente das literaturas abordadas: GUAN *et al.*, 2012, ($X^2=8,56$ e $p=0,0138$), ALVIM *et al.*, 2010 ($X^2=7,55$ e $p=0,0229$), SCHWANKE *et al.*, 2002, ($X^2=9,55$ e $p=0,0084$), ANUURAD, 2006 - pacientes afro-americanos ($X^2=7,06$ e $p=0,0293$) e caucasianos ($X^2=8,16$ e $p=0,0169$), MAHFOUZ, *et al.*, 2013 ($X^2=9,79$ e $p=0,0075$), ZELJKO, *et al.*, 2011 ($X^2=8,26$ e $p=0,0161$).

Como esperado, a média de idade foi significativamente maior no grupo CT acima da mediana. No entanto, as médias de IMC foram significativamente maiores para os grupos CT, LDL-C e HDL-C abaixo da mediana. Já no grupo TG acima da mediana, a média de IMC foi maior do que no grupo abaixo da mediana. Níveis mais altos de TG podem estar associados a uma alimentação inadequada (rica em TG), o que, por conseguinte resultaria no aumento de IMC. No entanto, deve-se levar em conta que além da alimentação, o IMC também é influenciado pela prática de atividades físicas. Atualmente, ocorre o consumo de alimentos industrializados, bastante palatáveis e calóricos, os quais são considerados uma das causas da obesidade. Além disso, a obesidade é influenciada por muitos fatores, como a falta de atividades físicas, fatores genéticos, entre outros (Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, 2014).

8. CONCLUSÕES

A mutação *C660X* do gene *LDLR* não foi encontrada em nenhum dos 72 indivíduos com dislipidemias analisados. No entanto, encontrou-se uma associação significativa entre a mutação *R3500Q* do gene *APOB* e aumentos dos níveis de CT, sendo tal alteração genética um fator de risco para níveis elevados de CT independente de gênero e idade.

Já o alelo $\epsilon 4$ do gene *APOE* foi significativamente mais frequente em indivíduos com níveis mais altos de CT e LDL-C, enquanto que o alelo $\epsilon 2$ teve uma frequência maior em indivíduos com níveis mais altos de HDL-C.

A média de idade foi significativamente maior em indivíduos com níveis de CT mais altos. Já a média de IMC foi significativamente maior em indivíduos com níveis mais baixos de CT, LDL-C e HDL-C e em indivíduos com níveis mais altos de TG.

As frequências alélicas dos genes *APOB* e *APOE* variam bastante entre as diferentes populações.

9. REFERÊNCIAS

- ALVIM R. O. *et al.* APOE polymorphism is associated with lipid profile, but not with arterial stiffness in the general population. **Lipids in Health and Disease**. v. 9, p. 1-7, 2010.
- ANUURAD E. *et al.* Protective effect of apolipoprotein E2 on coronary artery disease in African Americans is mediated through lipoprotein cholesterol. **Journal of Lipid Research**. v. 47, p. 2475-2481, 2006.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) **SAÚDE E ECONOMIA** Ano III – edição nº 6 outubro, 2011.
- AWAD N. S.; EL-TARRAS A. E. Analysis of the APO B R3500Q Mutation and APOE Polymorphism in Taif Saudi Population using Polymerase Chain Reaction- Reverses Hybridization Technique. **J. Mol. Biomark. Diagn.** v. 2, p. 1-4, 2011.
- BAIGENT C. *et al.* Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. **Lancet**. v. 376, p. 1670–1681, 2010.
- BENNET A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk American Medical Association. **JAMA**. v. 298, n.11, p. 1300-1311, 2007.
- BERTONI V. M.; ZANARDO V. P. S.; CENI G. C. Avaliação do perfil lipídico dos pacientes com dislipidemia atendidos no ambulatório de especialidades de nutrição da uricepp. **PERSPECTIVA, Erechim**. v.35, n.129, p. 177-188, 2011.
- BLACKHART B. *et al.* Structure of the human apolipoprotein B gene. **J. Biol. Chem.** v. 261, n. 33, p. 15364-15367, 1986.

BOURBON M. Factores genéticos e a doença cardiovascular. **Rev. Port. Cardiol.** v. 27, p. 1559-1563, 2008.

BUDOWLE B. *et al.* Analysis of the VNTR locus dis80 by the pcr followed by high-resolution page **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 48, p. 137-144, 1991.

BURTIS C. A.; ASHWOOD E. R.; BRUNS D. E. **Tietz, fundamentos de química clínica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 6 ed., p. 414, 2008

CAÇÃO J. C. *et al.* Polimorfismo da apolipoproteína e nos familiares em primeiro grau de pacientes com doença de alzheimer familiar ou esporádica. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 65, p. 295-298, 2007.

CASTILLO S. *et al.* The apolipoprotein b r3500q gene mutation in spanish subjects with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis.** v. 165, p. 127-135, 2002.

CHACRA A. P. M.; SANTOS R. D.; MARTINEZ . L .R. Hipercolesterolemia Familiar. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo.** v. 14, n.3, p. 462-475, 2004.

FARD-ESFAHANI P. *et al.* Familial defective apolipoprotein B 100: frequency of R3500Q mutation of apolipoprotein B gene in iranian hypercholesterolemic patients. **Acta Medica Iranica.** v. 43, n. 3, p. 193-196, 2005.

FARROKHI E. *et al.* Molecular characterization of iranian patients with possible Familial Hypercholesterolemia. **Ind. J. Clin. Biochem.** v. 26, n. 3, p. 244-248, 2011.

REFERENCE B. A. *et al.* Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 60, n. 25, p. 2631-2639, 2012.

FERREIRA C. N. **Polimorfismos dos Genes Apolipoproteínas E e A5 e Relação Com Parâmetros Bioquímicos e Hemostáticos Em Dislipidêmicos.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

FIGUEIREDO M. S.; SANTOS J. E. D.; ALBERTO F. L.; ZAGO M. A. High frequency of the lebanese allele of the LDLR gene among brazilian patients with familial hypercholesterolaemia. **J. Med. Genet.** v. 29, p. 813-815, 1992.

FOLEY, S. M. Update on risk factors for atherosclerosis: the role of inflammation and apolipoprotein E. **Medsurg Nursing.** v. 14, n. 1, p. 43-50, 2005.

FONTES R. **Metabolismo do colesterol e ácidos biliares.** Disponível em: <users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/.../G16_colesterol_ac_biliares.pdf>. Acessado em: 13/08/2010.

FORD E. S.; MOKDAD A. H.; AJANI U. A. Trends in risk factors for cardiovascular disease among children and adolescents in the United States. **Pediatrics.** v. 114, p. 1534-1544, 2004.

FORTI N. *et al.* Alterações genéticas e colesterolemia: recentes estudos. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 80, n. 5, p. 565-571, 2003.

FRIKKE-SCHMIDT R. *et al.* Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. **J. Lipid. Res.** v. 41, p. 1812-1822, 2000.

GAFFNEY D. *et al.* Independent mutations at codon 3500 of the apolipoprotein B gene are associated with hyperlipidaemia. **Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol.** v. 15, p. 1025-1029, 1995.

GAFFNEY D, *et al.* Influence of an asparagine to lysine mutation at aminoacid 3516 of apolipoprotein B on low-density lipoprotein receptor binding. **Clin. Chem. Acta.** v. 321, p. 113-121, 2002.

GENETEST **Hipercolesterolemia Familiar.** Disponível em: <http://www.genetest.pt/index.php?id=4&testid=6>. Acessado em: 15/08/2010.

GOLDSTEIN J. L.; HOBBS H. H.; BROWN M. S. Familial hypercholesterolemia In: Scriver CR ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease. **New York: McGraw Hill.** p. 2863-2913, 2001.

GREENOW K.; PEARCE N. J.; RAMJI D. P. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. **J. Mol. Med.** v. 83, p. 329-342, 2005.

GUAN S. *et al.* The relationship between apolipoprotein (apo) E polymorphism and lipid changes: An 8-year cohort study in Beijing elderly persons. **Archives of Gerontology and Geriatrics.** v. 55, p. 713-717, 2012.

HANSSON G. K. Mechanisms of disease inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.** v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HEEREN J.; BEISIEGEL U.; GREWAL T. Apolipoprotein E recycling. Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 26, p. 442-448, 2006.

HOPKINS P. N.; WU L. L.; HUNT S. C.; BRINTON E. A. Plasma triglycerides and type III hyperlipidemia are independently associated with premature familial coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 45, n. 7, p. 1003-1012, 2005.

HORVATH A. *et al.* High frequency of the ApoB-100 R3500Q mutation in Bulgarian hypercholesterolaemic subjects. **J. Med. Genet.** v. 38, p. 536-540, 2001.

INNERARITY T. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 84, p. 6919-6923, 1987.

KESANIEMI Y. A.; EHNHOLM C.; MIETTINEN T. A. Intestinal cholesterol absorption efficiency in man is related to apoprotein E phenotype. **J. Clin. Invest.** v. 80, n. 2, p. 578-581, 1987.

LAHIRI D. K.; NURNBERGER J. R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research.** v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAMBERT M. *et al.* Determinants of lipid level variability in French-Canadian children with familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 21, n. 6, p. 979-984, 2001.

LEWINGTON S. *et al.* Prospective Studies Collaboration. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. **Lancet.** v. 370, n. 9602, p. 1829-1839, 2007.

LL A. A. *et al.* Hipercolesterolemia Familiar heterocigota: diagnóstico molecular y terapia combinada. Caso clínico. **Rev. Méd. Chile.** v. 135, p. 216-220, 2007.

MACEDO A. **Avaliação de parâmetros clínicos e nutricionais em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar heterozigótica.** Dissertação (Mestrado em Ciências)

– Pós-Graduação em Fisiopatologia Experimental. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MAHFOUZ R. A. *et al.*, Apolipoprotein E gene polymorphisms in Lebanese with hypercholesterolemia. **Gene**. v. 522, p. 84-88, 2013.

MAHLEY R. W.; INNERARITY T. L.; RALL S. C. Jr.; WEISGRABER K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **J. Lipid. Res.** v. 25, n. 12, p. 1277-1294, 1984.

MAHLEY R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**. v. 240, p. 622-630, 1988.

MURRAY R. K.; GRANNER D. K.; RODWELL V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada** São Paulo: McGraw-Hill, 27 ed., p. 207, 2007.

MYANT N. B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparison with familial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**. v. 104, p. 1-18, 1993.

NELKEN J. *et al.* Detection of familial defective apoB (FDB) mutations in hypercholesterolemic children and adolescents by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC). **Clinical Biochemistry**. v. 41, p. 395-399, 2008.

OLIVEIRA A. P. G.; CASTRO J. C. **Dislipidemias em crianças e adolescentes, abordagem, diagnóstico e tratamento.** Disponível em: <<http://www.medicina.ufmg.br/edump/ped/dislipidemias.htm>> Acessado em: 13/08/2010.

POIRIER J. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging.** v. 26, p. 355-361, 2005.

PULLINGER C. R. *et al.* Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity. **J. Clin. Invest.** v. 95, p. 1225-1234, 1995.

RADER D. J.; COHEN J.; HOBS H. Monogenic Hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. **J. Clin. Invest.** v. 111, n. 12, p. 1795-1803, 2003.

RALL S. C. Jr.; WEISGRABER K. H.; MAHLEY R. W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 8, p. 4171-8, 1982.

SANTOS, R. D *et al.* III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção de Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** Suplemento III, 2001.

SCHWANKE C. H. A. *et al.*, Análise da Associação entre Polimorfismo do Gene da Apolipoproteína E e Fatores de Risco Cardiovasculares em Idosos Longevos. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 78, n. 6, p. 561-570, 2002.

SCOTT J.; KNOTT T. J.; SHAW D. J.; BROOK J. D. Localization of genes encoding apolipoproteins CI, CII, and e to the p13---cen region of human chromosome 19. **Hum. Genet.** v. 71, n. 2, p. 144-146, 1985.

SHEN H. *et al.* Familial Defective Apolipoprotein B-100 and Increased Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Calcification in the Old Order Amish. **Arch. Intern. Med.** v. 170, n. 20, p. 1850-1855, 2010.

SHAM P. C.; CURTIS D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Ann. Hum. Genet.** v. 59, p. 97-105. 1995.

SILVA S. C. P. **Estudos funcionais para determinação da patogenicidade de novas mutações no gene LDLR – diagnóstico e caracterização molecular da Hipercolesterolemia Familiar.** Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética) – Departamento de Biologia Vegetal. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Disponível em: <http://www.sbcbm.org.br/imagens/PressKit_SBCBM.pdf>. Acessado em: 21/03/2014.

SORIA L. F. *et al.* Association between a specific Apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B100. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 86, p. 587-591, 1989.

SOUZA G. M. A.; ROMANO N. L.; WHITTLE M. R. Efficient mispriming during apolipoprotein E genotyping. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 41, n. 1, p. 25-28, 2005.

SOUZA D. R. S. *et al.* Relevance of apolipoprotein e4 for the lipid profile of Brazilian patients with coronary artery disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 40, n. 2, 2007.

SOUZA D. R. S. *et al.* Polimorfismo da apolipoproteína E na doença de Alzheimer tipo tardio: resultados preliminares. **Revista de Psiquiatria Clínica.** v. 25, n. 2, 1998.

SPOSITO A. C. *et al.* IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção Da Aterosclerose - Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira De Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v. 88, Suplemento I, 2007.

TOPIC, A. *et al.*, Genderrelated effect of apo E polymorphism on lipoprotein particle sizes in the middle-aged subjects. **Clinical Biochemistry.** v. 41, p. 361-367, 2008.

TRAPANI L.; SEGATTO M.; PALLOTTINI V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: the liver as a metabolic “power station”. **World J. Hepatol.** v. 4, n. 6, p. 184-190, 2012.

VIEIRA J. R. S. Hipercolesterolemia e risco genético para doença arterial coronária. **NewsLab.** ed. 72, p. 116-130, 2005.

WALUS´MIARKA M. *et al.* A novel mutation (cys308phe) of the LDL receptor gene in families from the south-eastern part of Poland. **Mol. Biol. Rep.** v. 39, n. 5, p. 5181-5186, 2012.

WARD H. *et al.* APOE genotype, lipids, and coronary heart disease risk. **Arch. Intern. Med.** v. 69, p. 1424-1429, 2009.

WEISGRABER K. H.; RALL S. C. Jr; MAHLEY R. W. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. **J. Biol. Chem.** v. 256, p. 9077-9083, 1981.

WERUTZKY C. A. **As bases moleculares das hipercolesterolemias familiares no Brasil: o Rio Grande do Sul.** Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Investigação Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2006.

WILSON P. W.; SCHAEFER E. J.; LARSON M. G.; ORDOVAS J. M. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v. 16, n. 10, p. 1250-1255, 1996.

YUSUF S. *et al.* INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet.** v. 364, n. 9438, p. 937-952, 2004.

XAVIER H. T. *et al.* V Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 101, n. 4, suplemento 1, 2013.

ZELJKO H. M. *et al.* E2 allele of the Apolipoprotein E gene polymorphism is predictive for obesity status in Roma minority population of Croatia. **Lipids in Health and Disease.** v. 10, n. 9, p. 1-5, 2011.

ZHANG Y. *et al.*, A monomeric, biologically active, full-length human apolipoprotein E. **Biochemistry.** v. 46, p.10722-10732, 2007.

10. APÊNDICES

10.1 DESCRIÇÃO DETALHADA DAS METODOLOGIAS E RESULTADOS

10.1.1 PCR-RFLP para a mutação C660X do gene *LDLR*

Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizaram-se os primers 5'-GAACTGGTGTGAGAGGACCA-3' e 5'-TGTGAGGCAGCTCCTCATGT-3', destinados à amplificação seletiva de um fragmento de 148 pb do éxon 14 do gene *LDLR*. O volume final da reação foi de 11µL, sendo 1µL de DNA (100ng e 20ng), 0,52µL do primer LDL-R sense (10pM), 0,44µL do primer LDL-R antisense (10pM) e 9µL de supermix. O tubo branco apresentou a mesma composição dos anteriores, com exceção da presença de DNA. Posteriormente a Reação em Cadeia da Polimerase seguiu FIGUEIREDO, SANTOS, ALBERTO e ZAGO, 1992, com alteração no passo 2, em que a amostra permaneceu por 30 segundos a 55°C, e não por 10 segundos nessa temperatura (FIGUEIREDO, SANTOS, ALBERTO e ZAGO, 1992):

- Passo 1: 94° C por 3 minutos;
- Passo 2: 35 ciclos, sendo cada um constituído por 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 60 segundos a 72°C;
- Passo 3: 10 minutos a 72°C e 99 minutos e 59 segundos a 4°C.

Posteriormente realizou-se digestão do material da PCR com a enzima de restrição *Hinfl*, a qual reconhece o sítio de restrição GANTC. Esse sítio é gerado em indivíduos com a mutação C660X do gene *LDLR*, sendo reconhecido pela enzima que cliva o DNA e produz dois fragmentos, um de 51 e outro de 97 pb (FIGUEIREDO, SANTOS, ALBERTO e ZAGO, 1992).

Após a digestão enzimática, prosseguiu-se com eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%. A corrida eletroforética se deu em 200V, 35mA e 60W por 130

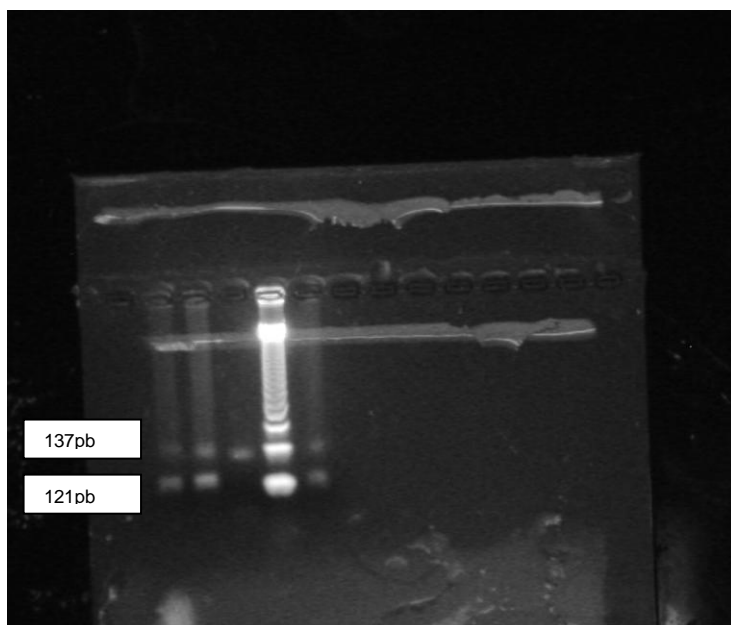
min. A coloração adotada para o Gel de Poliacrilamida será a de Nitrato de Prata segundo BUDOWLE, *et al.* 1991.

10.1.2 VALIDAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA *Hinf I*

A validação da atividade enzimática da *Hinf I* foi realizada em um segmento de DNA do gene *BCHE*, o qual codifica uma enzima denominada butirilcolinesterase.

Utilizando-se um par de primers (Bche 4) amplificou-se um fragmento de 258 pb e que inclui um sítio de restrição para a enzima (GANTC). O sítio de reconhecimento inicia-se em 2377pb e termina em 2381pb. Após o reconhecimento da sequência, o material amplificado foi clivado e gerou dois fragmentos: 137pb e 121pb.

Figura 1: Gel de Agarose a 0,5%, mostrando os fragmentos de DNA gerados após a digestão enzimática com a *Hinf I*.



Gel de agarose: Nos 3 primeiros pocinhos (à esquerda) observam-se bandas de 137 e 121pb, resultantes da digestão enzimática pela *Hinf I*. No 4º pocinho (da esquerda para a direita) há o marcador de peso molecular, DNA Ladder 100pb. No último pocinho (direita) também há material digerido pela enzima, sendo possível observar as bandas de 137 e 121pb.

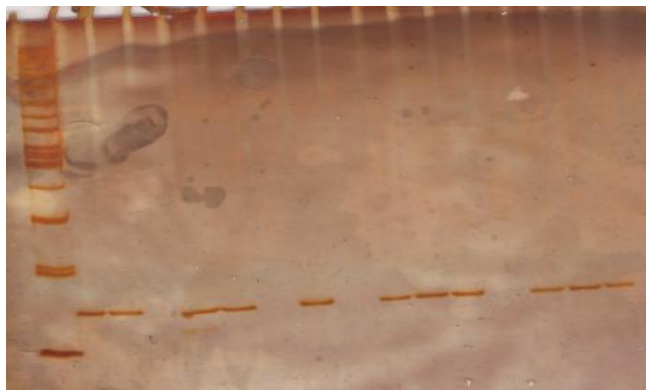
10.1.3 RESULTADOS

- **GENE *LDLR***

Foram analisadas 72 amostras com alterações no perfil lipídico (CT e/ou, LDLc e/ou TG aumentados e/ou HDL baixo). Nenhuma apresentou a mutação C660X do gene *LDLR*. Dessa forma, é possível excluir a principal causa de HF.

Na **Figura 3** encontra-se a foto do Gel de Poliacrilamida a 9% colorido com nitrato de prata. Todas as amostras apresentam uma banda de 148pb, ou seja, todos são homozigotos para o alelo normal (*C/C*).

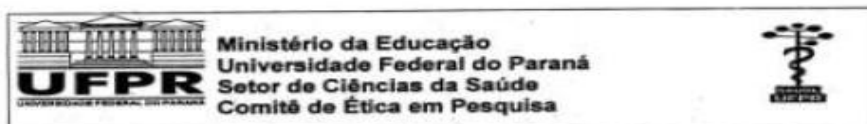
Figura 2: Gel de Poliacrilamida a 9% para análise do gene *LDLR*.



Gel de Poliacrilamida a 9%: No 1º pocinho (à esquerda) há o marcador de peso molecular, DNA Ladder 100pb. Os pocinhos seguintes correspondem a amostras amplificadas do gene *LDLR* submetidas a digestão pela *Hinf I*. Essas amostras apresentam 148pb, ou seja, são homozigotos para o alelo normal (*C/C*).

11. ANEXO

11.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 13 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Neiva Leite
Raul Osiecki
Ana claudia Vecchi Osiecki
Luciana da Silva timossi
Jean Fuzetti Cavazza

Nesta

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da saúde global, doenças crônicas e fatores associados em trabalhadores**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 06 de julho de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 26 de agosto de 2011.

Registro CEP/SD: 1159.084.11.06

CAAE: 0082.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial: 13/03/2012.

Atenciosamente

Profª. Drª. Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Rua Padre Camargo, 280 - Alto da Glória - Curitiba-PR - CEP 85051-240
Fone: (41)3363-7259 - e-mail: comiteticidade@ufpr.br